

ÜBER DIE WIRKUNG EINIGER ANALOGE
VON ANGIOTENSIN I, II UND III
AUF DIE REZEPTORBINDUNG
UND DIE ALDOSTERONFREISETZUNG
AUS DER NEBENNIERENRINDE *

Disbui. München

1987

MICHAIL L. MICHAILOV



AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORSTAND: PROF. DR. MED. E. BUCHBORN

ÜBER DIE WIRKUNG EINIGER ANALOGE
VON ANGIOTENSIN I, II UND III
AUF DIE REZEPTORBINDUNG
UND DIE ALDOSTERONFREISETZUNG
AUS DER NEBENNIERENRINDE *

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT zu MÜNCHEN

vorgelegt von

MICHAIL L. MICHAILOV

aus Vladimirovo (Luta)

1987

* Mit Unterstützung der Weltgesundheitsorganisation,
M8/181/4/M.146

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. H. Witzgall

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. E. Buchborn
2. Prof. Dr. A. Baethmann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.1987

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	5
B. Stand der Forschung	9
1. Physiologie der Angiotensine	9
1.1. Angiotensin I	11
1.2. Angiotensin II	11
1.3. Angiotensin III	14
1.4. Angiotensin-Aldosteron Beziehungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	15
1.5. Angiotensin-Analoge	17
1.6. Angiotensin-Antagonisten	20
2. Physiologie des Aldosterons	21
2.1. Natriumionentransport	25
2.2. Steuerung der Aldosteronaktivität	26
C. Aufgabenstellung	30
D. Material und Methoden	32
I. Material	32
II. Methoden	33
1. Studium der Angiotensin-Rezeptorbindung	33
1.1. Präparation der subzellulären Fraktion der glatten Muskulatur	33
1.2. Präparation der subzellulären Fraktion der Glomerulosazellen	34
1.3. Vorgang der Rezeptorbindung	34

	Seite
II. 1.4. Auswertung der Daten der Rezeptorbindung	35
II. 2. Aldosteronbestimmung	38
II. 2.1. Herstellung einer Suspension aus Glomerulosazellen der Nebennierenrinde	38
II. 2.2. Inkubation der Zellsuspension mit Peptiden	39
II. 2.3. Vorgang der Aldosteronbestimmung	39
II. 2.4. Auswertung der RIA-Daten der Aldosteronmessung	40
E. Ergebnisse	43
1. Rezeptorbindungsstudium	43
1.1. Glatte Muskulatur	43
1.2. Zona glomerulosa der Nebennierenrinde	45
1.2.1. Angiotensin I und Verwandte	48
1.2.2. Angiotensin II- und III-Antagonisten	48
1.3. Vergleich der Rezeptorbindungsfähigkeit von Okta- und Heptapeptiden in der glatten Muskulatur und der Zona glomerulosa	52
2. Aldosteronproduktion	55
2.1. Stimulation der Aldosteronfreisetzung durch Angiotensin II- und III-Analoga	55
2.2. Stimulation der Aldosteronproduktion durch Angiotensin I und seine Verwandten	57
2.3. Agonistische Eigenschaften der Angiotensin-Antagonisten	61

	Seite
2.4. Inhibition der Aldosteronsekretion durch Angiotensin II- und III-Anta- gonisten	65
3. Vergleich der Rezeptorbindung mit der Aldosteronproduktion durch Angiotensin I-, II- und III-Analoga in der Zona glomeru- losa der Nebennierenrinde	67
F. Diskussion	75
G. Zusammenfassung	86
D. Literaturverzeichnis	88

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AI	-	Angiotensin I	Ser	-	Serin
AII	-	Angiotensin II	Thr	-	Threonin
AIII	-	Angiotensin III	Tyr	-	Tyrosin
ACE	-	AI-converting Enzym	Val	-	Valin
ANP	-	atrial-natriuretische Peptide			
ANV	-	akutes Nierenversagen			
Arg	-	Arginin			
Asp	-	Asparaginsäure			
CHI	-	chronische Herzinsuffizienz			
cpm	-	Impulse/min			
Des	-	Desalination, Beseitigung			
ED ₅₀	-	mittlere effektive Dosis			
GFR	-	glomeruläre Filtrationsrate			
Gly	-	Glycin			
His	-	Histidin			
ID ₅₀	-	mittlere Inhibitionsdosis			
Ile	-	Isoleucin			
k	-	konstante			
Leu	-	Leucin			
Me	-	Methylgruppe			
MW	-	Mittelwert			
n	-	Anzahl			
pA-Wert	-	negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration eines Angiotensin-Antagonisten, der die Wirkung der doppelten Konzentration eines Angiotensin-Agonisten vermindert.			
Phe	-	Phenylalanin			
Pro	-	Prolin			
r	-	Korrelationskoeffizient			
RAS	-	Renin-Angiotensin-System			
RIA	-	radioimmunologische Bestimmung			
Sar	-	Sarcosin			
SEM	-	Standardfehler des Mittelwertes			

A. EINLEITUNG

F. Gross veröffentlichte 1958 als erster einen Bericht (53) über die Schlüsselstellung des Angiotensins für die Aldosteronsekretion in der Nebennierenrinde. Daraufhin wurde diese physiologische Beziehung zum Mittelpunkt vieler Auseinandersetzungen und eröffnete ein weites Forschungsfeld.

In der Biochemie gelang vorher Simpson und Tait 1952 (127) die Isolierung von Aldosteron, Bumpus et al. 1957 (21) sowie Schwyzer et al. 1957 (123) die organische Synthese von Angiotensinen. Marshall et al. (80) synthetisierte 1971 den ersten Angiotensin-Antagonisten. Blair-West et al. (11) beschrieb 1971 die stimulierende Wirkung des Angiotensin II-Metaboliten, des sogenannten Angiotensins III, auf die Aldosteronproduktion als ähnlich der von Angiotensin II.

Die Modifizierung des Angiotensin-Aldosteron-Mechanismus durch die Anwendung verschiedener Angiotensin-Analoga mit agonistischen oder antagonistischen Eigenschaften bringt Licht in Mechanismen, wie hypertensive und hypotensive Erkrankungen, ödematose Zustände u.a. Die Reaktion der Nebennierenrinde auf Angiotensin beruht auf dem Vorhandensein von spezifischen Rezeptoren auf den Zellplasmamembranen der Zona glomerulosa. Die Zahl dieser Reizempfänger, ihre Affinität, Reaktionsbereitschaft, Inaktivierung, der Umfang der offenen Stellen können durch konkurrenzfähige Angiotensin-Analoga beeinflusst werden. Die Rezeptorbindung korreliert sehr streng mit dem pharmakologischen Potential von Angiotensin-Agonisten und -Antagonisten. Die Messung der Angiotensin- und Aldosteron-Konzentration im zirkulierenden Blutplasma stellt ein Spiegelbild der Aktivität des Angiotensin-Aldosteron-Wirkungsmechanismus dar.

Es darf angenommen werden, daß das Angiotensin eine herausragende Rolle bei der Kontrolle des Blutdruckes und bei der Balance des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes sowohl von Hormonfreisetzungen, wie Aldosteron und Katecholamine aus der Nebennierenrinde oder Vasopressin aus der Neurohypophyse, spielt. Das Renin-Angiotensin-System (RAS) wird bei der Mehrheit der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHI) stimuliert (57,88,104). Diese Stimulation dient der Optimierung der Vordehnung und der Kontraktilität des Herzmuskels (47). Es verstärken sich Vasokonstriktion, Natriumretention sowie die Freisetzung von Katecholaminen, um der Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens bei Herzinsuffizienz entgegenzuwirken. Die Stimulation des RAS bei akuter Hämorrhagie bzw. hämorrhagischem Schock wird seit langem als Verteidigungsreaktion angesehen (89).

Die pharmakologische Unterdrückung der Angiotensin-Aldosteron-Stimulation bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, akutem Nierenversagen nach Nierentransplantation, bei Angiotensin-abhängiger Hypertonie u.a. kann wegen ihrer Beeinflussung der GFR und tubulärer Na^+ -Rückresorption zur Wiederherstellung der normalen Verhältnisse führen. Die Verwendung von Angiotensin-Antagonisten, die eine Blockade des RAS bewirken, reduziert das Auftreten von akutem Nierenversagen und Hypertonie nach erfolgreicher durchgeführter Nierentransplantation um die Hälfte (64). $\text{Sar}^1\text{Ile}^8\text{AII}$ wurde im Tierexperiment bei akutem Atemnotsyndrom mit Lungenödem als therapeutische Mittel geprüft (143).

Angiotensin II ist die physiologisch aktivste Komponente des Renin-Angiotensin-Systems. Die Wirkung des Angiotensins wird durch spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der

Zellplasmamembranen der Zielorgane vermittelt. Verschiedene Angiotensin-Analoga wetteifern mit dem endogenen Angiotensin um die Besetzung dieser Rezeptorstellen. Hinzu kommt die Aufgabe, potente und spezifische Substanzen zu finden, die den Effekt des endogenen Angiotensins einschränken. Eine Annäherung an dieses Ziel erfolgt durch die Herstellung von synthetischen Angiotensin II (AII)- und Angiotensin III (AIII)-Analogen, deren strukturelle Modifikationen günstige und zweckmäßige Wirkungen im Vergleich zu natürlichem AII und AIII hervorbringen. Diese Peptide verfügen über agonistische und antagonistische Eigenschaften, deren Identifizierung spezielle Untersuchungen verlangt. Die Angiotensinrezeptoren stellen Makromoleküle dar und binden sowohl die natürlichen als auch die synthetischen Peptide. Konkurrenzfähige Peptide mit spezifischen molekularen Mechanismen, d.h. mit Intrinsic-Aktivität, binden sich an Rezeptorproteine und transferieren ihre Eigenschaften in eine zelluläre Reaktion.

Die durch natürliches AII und AIII stimulierte Aldosteronsekretion wird logischerweise durch kompetitive Antagonisten durch die Besetzung der spezifischen Rezeptoren in der Nebennierenrinde gehemmt. Hierdurch kommen die Angiotensin-Antagonisten zur Unterdrückung des Hyperaldosteronismus in Betracht. Ein Infusionstest des AII-Analogons Saralasin wurde zur Screeningsdiagnostik der Nierenarterienstenose bei renovaskulärer Hypertonie sowie zur Optimierung der Therapie der "volumenresistenten" Hypertonie unter Hämodialysebedingungen durchgeführt. Wegen Auftretens von Resistenz und hypertensiver Reaktionen in Einzelfällen nach Applikation dieses Präparates findet dieses Verfahren in der Gegenwart keine breite Anwendung (99). Die durch

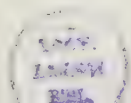
Angiotensin vermittelte Vasokonstriktion und Natriumretention, die sowohl durch einen direkten Effekt auf den renalen Natriumtransport als auch via Aldosteronregulation bei einer Stimulation des RAAS erfolgen können, mit Angiotensin-Antagonisten beeinflusst werden. Die bewährten therapeutischen Mittel bei chronischer Herzinsuffizienz, wie positiv inotrope Wirkstoffe u.ä., sollten durch eine Erweiterung der pharmakologischen Therapie ergänzt werden [1]. Dieser Schritt ist von der Entwicklung effektiv wirkender Angiotensin-Antagonisten abhängig.

B. STAND DER FORSCHUNG

1. Physiologie der Angiotensine

Die Konzeption eines im Blutplasma zirkulierenden endokrinen Systems, worin das durch das Renin erzeugte Angiotensin I in AII durch das AI-converting Enzym (ACE) umgewandelt wird und potente Effekte auf die Regulation des Blutdruckes und die Elektrolytebalance ausübt, erfordert heutzutage eine Weiterentwicklung. Neue Untersuchungen erbrachten, daß AII in größerem Umfang im Gewebe als im Plasma gebildet wird, wobei der Bedarf an dem in der Niere erzeugten Renin und aus der Leber kommenden Reninsubstrat Angiotensinogen durch die Zirkulation gedeckt wird, d.h. es existiert parallel ein Angiotensin-System im Gewebe, insbesondere im ZNS, in den Nieren, der Gefäßwand, den Nebennieren und Hoden (23,97,131). Diese lokalen Gewebe bzw. Zellen sind fähig, das Angiotensinogen zu produzieren (100). Offensichtlich, ist das gewebliche Angiotensin-System in das zirkulierende RAS integriert. Die Konversion von Angiotensinen und ihren Aminosäuresequenzen wird in Abb. 1 demonstriert.

Die physiologische Wirkung der Angiotensine ist zeitlich beschränkt durch einen raschen Abbau mittels proteolytischer Enzyme im Plasma oder durch Rezeptorbindung im Gewebe. Die rezeptorvermittelte Endocytosis bildet den Hauptweg, um AII schnell abzubauen. Die Alpha-Aminopeptidase A wirkt auf den N-Terminus der Peptidkette, die Carboxylase C, Pepsin und Chymotrypsin auf den C-Terminus (19,74). Die Erhöhung der Angiotensinkonzentration im Plasma sowie im Gewebe kennzeichnet eine Aktivierung des RAS. Die AII-abbauenden Enzyme in der Zirkulation besitzen 20 bis 40 min Halbwertszeit und können demzufolge mehrmals in den AII-Metabolismus eingreifen. Die Beseitigung der Angiotensine aus der Zirkulation hängt von



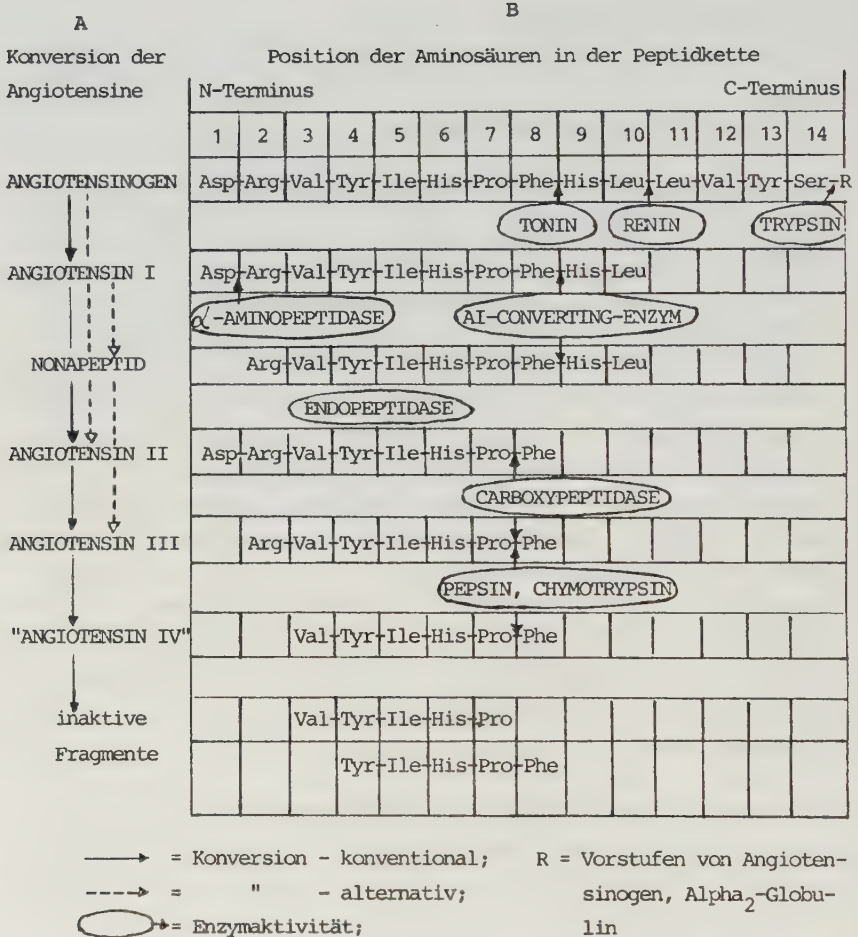


Abb. 1: Schematische Darstellung des Angiotensinmetabolismus:

A: Abbau von Angiotensinogen und Konversion des AI in AII sowie Umwandlung von AII in AIII und inaktive Angiotensinfragmente.

B: Aminosäuresequenzen sowie ihr Zerfall durch angreifende Enzyme.

den Endothelzellstrukturen in einzelnen Organen ab, wobei sie bevorzugt durch das Epithelium der Nebennieren und der renalen Glomeruli filtrierte und an die Membranrezeptoren gebunden werden.

1.1. Angiotensin I

Das Dekapeptid Angiotensin I wirkt auf die Rezeptoren einer Anzahl von Geweben, um eine gefäßverengende und sekretorische Antwortreaktion hervorzurufen. Seine renale Aktivität, welche proximal-tubulär und/oder auf der Glomerularebene zustandekommt, reduziert konsequent die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), wobei der prä- und postglomeruläre Widerstand ansteigt (59, 97). Eine vermehrte Konzentration von AI im Plasma erhöht die Aktivität der membrangebundenen ACE - Exopeptidase - in Endothelialzellen (117). Obwohl das AI auf die Vasokonstriktion und die Aldosteronproduktion nur geringfügig wirkt, summiert sich doch sein Effekt durch die Stimulation des RAS, indem seine Konzentration auf das Vielfache ansteigen kann (19).

1.2. Angiotensin II

Die Aminosäuresequenz des AII wird in Abb. 2 dargestellt. Es wird angenommen, daß das C-terminale Phenylalanin des AII-Moleküls die Rezeptoraktivierung veranlaßt, während die Aminosäuresequenz Tyr⁴-Ile⁵-His⁶ in der wirksamen Konformation für die Rezeptorbindungsaffinität verantwortlich ist. Die mögliche intramolekulare Wechselwirkung verfügt im AII-Molekül über aktive Gruppen und bezieht vor allem Tyrosin⁴ und Histidin⁶ ein. Diese Befunde sind vereinbar mit der Existenz eines Relaisystems von Tyrosin-Histidin-Karboxylat. Die Präsenz dieses Systems des in wäßrigem Milieu gelösten AII

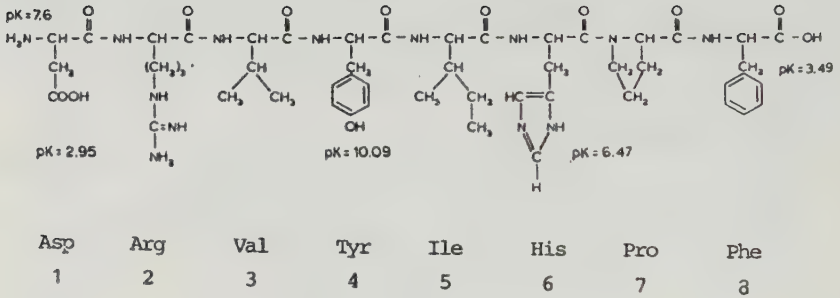


Abb. 2: Lineare Primärstruktur von Angiotensin II und die pK-Werte der ionisierbaren Gruppen in verschiedenen Positionen der Aminosäuresequenz. pK-Wert ist negativer dekadischer Logarithmus der Aciditäts- oder Basekonstante, quantitativ nach dem Massenwirkungsgesetz ausgedrückt. Die Base funktioniert als Protonakzeptor. Die Angiotensinverbindung erfährt in physiologischen Solventia durch ihre Flexibilität verschiedene Konformationen und entfaltet unterschiedliche Aktivität.

läßt vermuten, daß AII bei der Rezeptorbindung eine Enzymwirkung ähnlich der Serinprotease entfaltet (92).

Das Oktapeptid AII greift vielseitig sowohl in intrarenale als auch in extrarenale Funktionen ein. Dadurch werden die

Regulation des arteriellen Blutdruckes, der Gefäßwiderstand, die Membranpermeabilität, die Elektrolyteexkretion, der Wasserhaushalt, das extrazelluläre Flüssigkeits- sowie Blutvolumen wesentlich beeinflusst. Die hauptsächliche intrarenale Wirkung des AII umfaßt die Kontrolle der GFR sowie der Natrium- und Wasser-Ausscheidung. AII wirkt auf die GFR vorzugsweise durch die Verengung der efferenten Arteriolen und schränkt dadurch das gesamte Flüssigkeitsvolumen ein (57). Dabei kommt eine direkte Wirkung auf die glatten Muskelzellen zustande. Die Stimulierung des AII-Mechanismus nach Natriumentzug, wodurch die Natriurese sinkt, umfaßt eine direkte Aktivierung des Na^+ -Transportes und der Flüssigkeitsabsorption in den proximal gewundenen Tubulusteilen (Tubulus contortus), verringert den Plasmastrom in der Henle'schen Schleife und trägt zur Na^+ -Retention bei (94,144). Die Kontrolle von AII entlang dem Nephron ruft eine prä- und postglomeruläre Vaskonstriktion hervor und reguliert dadurch den gesamten Flüssigkeits- und Filtrationsstrom (130). Physiologische Konzentrationen von AII 10^{-11} - 10^{-9} M stimulieren den elektro-neutralen Na^+ -Transport in den basolateralen Membranen der Endothelialzellen, während die pharmakologische Dosis von AII 10^{-7} M und höher die Rückresorption hemmt. Die stimulierenden Effekte von AII auf die Nierenfunktion erscheinen rezeptorvermittelt zu sein. Angiotensinrezeptoren in der Niere unterscheiden sich von jenen in der peripheren Zirkulation (59,86). Das meiste AII im renalen Blutstrom wird intrarenal gebildet. Die Niere baut ca. 90% des arteriell gelieferten AII ab (122). Die erhöhte intrarenale Produktion von AII im Verlauf der Stimulation des RAS bedingt die Veränderungen der renalen Funktionen.

Die in der Blutzirkulation vorhandene AII-Konzentration trägt hauptsächlich zur Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdruckes und zur Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde bei. Ein

hohes AII-Niveau im Blutplasma beteiligt sich an der Aufrechterhaltung des Blutdruckes bei Schockzuständen (89). Im Laufe der Schwangerschaft reagieren AII-Rezeptoren in den Arterien des gesamten Kreislaufes sowie in den Nieren vermindert, obwohl die endogene AII-Konzentration erhöht ist (18). Obgleich AII gefäßverengend wirkt und den peripheren Gefäßwiderstand erhöht, stimuliert die gestiegene endogene AII-Konzentration die Produktion von Prostaglandinen. Das erhöhte Prostaglandinangebot sowie die Stimulation der Kallikrein-Kinin-Synthese unterstützen die Mikrozirkulation (107,142). AII stimuliert auch den Durst und die Vasopressinfreisetzung, wodurch die Balance im Wasserhaushalt beeinflusst wird (17). Einige Releasing-Faktoren im ZNS haben Ähnlichkeit - vermutlich sogar Identität - mit AII (58).

Die Kontraktion der Gefäßmuskulatur durch Angiotensin II wird von einer Substratphosphorylierung im Myosin (6) und einer intensiven Lipolyse mit erhöhter Freisetzung von Eikosanoiden im Blutplasma begleitet (90,91). Die endogenen ungesättigten Fettsäuren inhibieren die Angiotensinrezeptoren (52). Die atrial-natriuretischen Peptide (ANP), sezerniert aus den zytoplasmatischen Granula-Ablagerungen in den Atriummuskelzellen des Herzens, heben weitgehend die durch AII verursachte Aldosteronsekretion auf (42). Die Hemmung der Aldosteronsekretion deutet an, daß die ANPsich als Modulator des Angiotensin-Aldosteron-Systems verhalten können. Die ANP beteiligen sich an der Regulation der Aldosteronproduktion auf dem Niveau der Proteinphosphorylierung (7).

1.3. Angiotensin III

Das Heptapeptid Angiotensin III ist ein Metabolit von AII. Außerdem kann seine Bildung alternativ über das Nonapeptid Des-Asp¹-AI erfolgen (siehe Abb. 1). Angiotensin III nimmt

an der physiologischen Aktivität des AII in verschiedenen Geweben teil und benutzt dabei dieselben Rezeptorstellen (96). AIII wird als ein potenter Stimulator der Aldosteronsekretion in der Nebennierenrinde betrachtet (11). Diese Tatsachen legen die Vermutung nahe, das AIII einen bedeutsamen Vermittler des RAS darstellt (38). Das relativ niedrige Verhältnis der Konzentration von AIII zu AII im Nebennierengewebe im Vergleich zu dem Uterus kann zum Teil durch unterschiedlichen enzymatischen Katabolismus dieser Peptide in der Nebennierenrinde verursacht werden (96). Obgleich AIII nur 15-30% des Effektes von AII in den glatten Muskelzellen entfaltet, kann es verschiedene Funktionen des AII, wie die Kontraktion der Uterusmuskulatur, die Regulation der Permeabilität in der Niere, die Stimulation der DNS- und Proteinsynthese, modifizieren. AIII zeigt eine ebenso potente vasokonstriktive Wirkung wie AII in der Leberzirkulation, in der peripheren Vaskulatur jedoch ist sie wesentlich niedriger. Die Differenzen zwischen beiden Peptiden bestehen in ihrer Abbaugeschwindigkeit, ihrer Teilnahme an der Freisetzung von Katecholaminen und ihrer Rezeptoraffinität (15).

1.4. Angiotensin-Aldosteron-Beziehungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Abbildung 3 stellt die Angiotensin-Aldosteron-Beziehungen dar, durch welche Angiotensine den Na^+ -Transport steuern. Angiotensine sind ein hormoneller Hauptregulator für die Aldosteronsekretion in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde (2). Das am stärksten wirkende AII dringt bei seinem Konzentrationsanstieg in der Blutzirkulation durch gefensterte Epithelzellen in die spezifischen Angiotensinrezeptoren auf der Oberfläche der Zellplasmamembranen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Eine Reihe von Studien äußern die Annahme, daß die Wirkung von AII durch das Calcium-Messenger-System ver-

mittelt wird. Es handelt sich dabei um ein $[Ca^{2+}]$ -Calmodulin-System, das durch das AII-induzierte Inositoltriphosphat aktiviert wird. (43).

Abbildung 4 enthält die von Ca^{2+} vermittelte Wirkung auf die Aldosteronsekretion sowie auf die Kontrolle der glatten Muskulatur. Der durch AII induzierte Abbau des Phospholipids - Inositol-3,4-bis-Phosphat - erscheint als initiales Ereignis bei der Wirkung von AII (10,45). Die stimulierte Phosphoinositolhydrolase greift multifunktional in den Transfer-Energie-Metabolismus ein. Bei dieser Abspaltung bilden sich Diazylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat. DAG dient der Stimulation der Proteinkinase C, die die Aktivität der Phospholipase A_2 stimuliert (70). Inositoltriphosphat mobilisiert $[Ca^{2+}]$ aus der intrazellulären nonmitochondrialen Speicherung des endoplasmatischen Retikulums. Dabei werden ca. 34% des austauschbaren Zell- Ca^{2+} -Pools in Bewegung gesetzt (22,44). Ein AII-Stimulus auf die Glomerulosazellen aktiviert auch die extrazelluläre Ca^{2+} -Ansammlung und ruft eine Ca^{2+} -Zufuhr hervor. Die Calcium-Zufuhr erfolgt über elektrische Induktion durch Calcium-Kanäle in die Zellmembranen. Diese Kanäle verhalten sich besonders sensitiv zur Depolarisation durch relativ geringe Veränderungen in der extrazellulären K^+ -Konzentration (1,77). Die Beziehung zwischen AII und der Guanidinnukleotidbindung ist möglicherweise verantwortlich für die Wirkung von AII in den Calciumkanälen die durch ein Nukleotid-Regulationssystem vermittelt wird (33).

1.5. Angiotensin-Analoge

Modifizierte Angiotensine, die auf synthetischem Weg erzeugt werden, nennt man Analoge. Manipulationen in ihrer Struktur bedingen Änderungen in ihrer physiologischen Aktivität. Die Substitution der Asparaginsäure durch Sarcosin bei N-Termini-

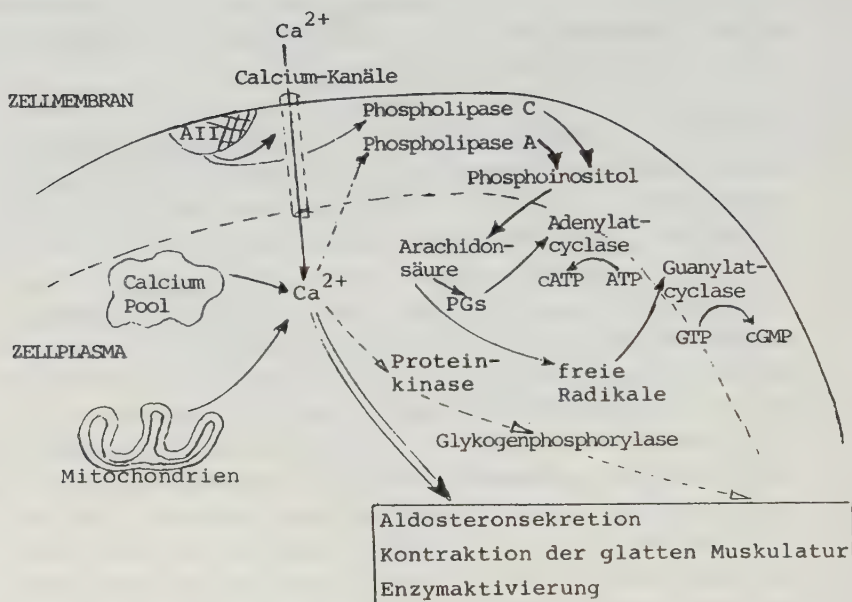


Abb.4: Schematische Darstellung der von Ca^{2+} vermittelten AII-Wirkungen: Angiotensin II (AII)-Effekt auf den Calciumeintritt in das Zytosol sowie die Verlagerung des Calciums vom Ca-Pool und den Mitochondrien. Die AII-Wirkung erfordert eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Die von Ca^{2+} vermittelten AII-Effekte spalten das Phospholipid ab, katalysieren energieliefernde Prozesse und induzieren die Enzymaktivitäten. Der Calciumionenaustritt aus dem Zellplasma trägt zur Verwirklichung der Angiotensin-Reaktion aus den Targetzellen bei.

nus der Angiotensinkette erhöht die pressorische Potenz und die Aldosteronproduktion beträchtlich sowie verzögert die metabolische Abbaugeschwindigkeit des Sarcosin¹-AII hinaus. Die Unterschiede in der Bindungskinetik zwischen AII und Sar¹-AII werden auf die erhöhte Bindungsaffinität des Analoges zu Rezeptoren sowie auf die verlangsamte enzymatische Verarbeitung seines AII-Rezeptor-Liganden in der Zelle zurückgeführt (41, 74). Der Austausch des Phenylalanin⁸ im C-Terminus der Peptidkette mit einer aliphatischen, lyophylen Gruppe zeigt eine niedrigere myotrope und pressorische Wirkung als das natürliche AII. Sowohl die Substitution jedes Gliedes in jeder Position der Aminosäuresequenz als auch Änderungen in der Seitenkette einzelner Aminosäuren ermöglichen eine Vielzahl von Wirkungsunterschieden. Der Austausch des Prolins⁷ mit Alanin in der 7. Position von AI determiniert die Affinität dieses Analoges für eine ACE-Inhibition. Die Ala⁷-Substitution in AI vermittelt eine verminderte Bindung mit den vaskulären Rezeptoren und ruft eine positiv-inotrope Wirkung am Herzen hervor (55).

Das Vorhandensein einer spezifischen Aktivität in manchen Aminosäuresequenzen, wie in den Hydroxyl- und Imidazol-Seitenketten von Tyrosin und Histidin, beschleunigt den Azetylierungs-Deazetylierungs-Mechanismus und ermöglicht die Eigenschaften eines Elektronenpaardonators. Es handelt sich um eine Wechselwirkung zwischen Tyrosin und Histidin in der AII-Aminosäuresequenz, wobei die Hydroxylgruppe von Tyrosin eine wesentliche Rolle bei der Entstehung ihrer physiologischen Aktivität spielt (92,118). Es wird angenommen, daß Tyrosin ein Relaisystem zur elektrischen Ladung beinhaltet, welches der Ordnung der Wechselwirkungen zwischen den His⁶- und Phe⁸-Ring des AII-Analoges dient (82). In den physiologisch aktiven Konformationen, gestatten resonanzfähige Strukturen die Versetzung des Ladungspotentials, die ursprünglich von Alpha-Karboxylat in 8. Position ausgegangen ist, zum His⁶-Ring,

damit eine bestimmte elektrostatische Induktion zwischen den aufnahmefähigen Platten durch die Ordnungsfunktion der His⁶- und Phe⁸-Ringe entstehen kann. Die Entladung dieses biochemischen Antriebes bildet die Antwortreaktion. Das Vorhandensein eines Phenyl-, Hydroxyl- oder Phenoydanions des Tyr⁴-Ringes in AII scheint relevant für die Aktivierung der Angiotensinrezeptoren in der glatten Muskulatur zu sein (83).

1.6. Angiotensin-Antagonisten

Wenn eine Substitution in der 8. Position der Sar¹-AII mit einer aliphatischen Aminosäure, wie Isoleucin, Threonin, Alanin oder Serin erfolgt, dann erwerben die bindungspotenten Angiotensin-Analoga antagonistische Eigenschaften gegenüber Effekten des natürlichen AII. Modifikationen in der C-terminalen Carboxylgruppe in der 8. Position bewirken die physiologischen Eigenschaften in der Rezeptoraffinität und spezifisch intramolekulare Aktivität von Angiotensin-Antagonisten. Desweiteren zeigt die Modifizierung des Sar¹-AII in der 4. Position durch die Methylierung mit einer O-Methylgruppe oder durch Tryptophan antagonistische Eigenschaften gegenüber der pressorischen Aktivität von natürlichem AII.

Sar¹-Tyr(Me)⁴-AII ist ein Antagonist, weil es kein Ladungssystem bilden kann. Sar¹-Ile⁸-AII ist ein Antagonist wegen seiner Unfähigkeit, eine Wechselwirkung zwischen Phe⁸-, His⁶- und Tyr⁴-Ring anzuordnen. Untersuchungen über die Rezeptorbindung von AII-Agonisten und -Antagonisten zeigten, daß beide Gruppen enge Bindungen in gleicher Art eingehen und daß sich deren Verarbeitungsrate in den Zellen annähert. Der molekulare Mechanismus der unterschiedlichen Wirkung von Agonisten und Antagonisten ist bisher ungeklärt. Natrium-sensitive Mechanismen beteiligen sich an der Rezeptorbindung

von Angiotensin-Analogen. Die erhöhte extrazelluläre Na^+ -Konzentration beschleunigt die Rezeptorbindung von Agonisten und vermindert die von Antagonisten (3). Die Befunde zeigen, daß der Umfang der Lösbarkeit von AII-Rezeptorbindungen im Leber- und Nebennieren-Gewebe mit einem Agonisten größer ist als mit einem Antagonisten. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich in der Teilnahme einer dritten Komponente des Bindungskomplexes in den Zellplasmamembranen zu suchen, welche an der Energieübertragung teilnehmen kann. Die Bildung solch einer Trias ist notwendig nicht nur für die Steroidgenese, sondern auch für das verzögerte Recycling des Rezeptorkomplexes (56).

2. Physiologie des Aldosterons

Die Zellen der Zona glomerulosa in der Nebennierenrinde bilden die ursprüngliche Quelle von zirkulierendem Aldosteron, dessen Sekretion als Reaktion auf verschiedene Stimuli erfolgt. Die Aldosteronsynthese ist von den in der Zona glomerulosa vorhandenen Enzymen der 11- β - und 18-Hydroxylation abhängig (141). Tabelle I gibt eine Übersicht über die physiologischen Regulationsfaktoren des Aldosterons. Die Aldosteronsekretion läßt sich über zwei verschiedene Wege stimulieren, die beide anscheinend auf die Bewegung der zytoplasmatischen Calciumionen beruhen (25,116). Die durch das ACTH stimulierte Aldosteronproduktion ist mit der cAMP verbunden, während die vom AII-induzierte cAMP-unabhängig verläuft. Das Kaliumion nimmt an der Regulation des RAS teil, indem es die Reninfreisetzung beeinflusst, die Aldosteronsekretion direkt stimuliert und die Angiotensinrezeptoren moduliert. Dadurch steuert das K^+ -Niveau die von den Peptiden veranlaßten sekretorischen Reaktionen (40). Kalium und AII regen die Aldosteronsekretion durch einen vom Ca^{2+} -Eintritt abhängigen Mechanismus an, während der ACTH-Effekt sowohl Calcium- als auch cAMP-abhängig ist (101). Wie bereits in Kapitel 1.4. aufgezeigt, wird die von AII stimulierte Aldosteronsynthese durch die rezept-

TABELLE I: Physiologische Regulation der Aldosteronsekretion

Aktivierung (Ref)	Hemmung (Ref)
A. Hauptregulatoren ACTH Angiotensin II Kalium (40)	ANP (atrial-natriuretische Peptide) (8,31) Somatostatin (111) Dopamin
B. Additionalere Regulationsfaktoren Prostaglandin E₂, I₂ (61,62) Serotonin (79) Aldosteron-stimulierender Faktor (124) Prolaktin (85) Acetylcholin (72) CRF (Kortikotropin-Releasing-Faktor) (65) ß-Endorphin (108) ß-Lipotropin (84) Wasserstoffionenkonzentration im Blut (pH) (28,69) metabolische Acidosis (4,109) ß-adrenergische Einwirkungen (Streß, Belastung) (37)	(27,135,137-139) Natriumüberschuß (5) Progesteron (93) Hypoxämia (110)

torgekoppelte Abspaltung des Inositol-4,5-bis-Phosphats in den Zellplasmamembranen initiiert. Dieser Abbau erzeugt DAG, das die Phospholipid-abhängige und Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase anregt, und zweitens Inositoltriphosphat, das $[\text{Ca}^{2+}]$ aus dem intrazellulären Pool freisetzt. Beide Spaltprodukte sind unumgänglich für eine maximale Zellreaktion auf AII (24,71).

Die für die Regulation des Natriumionentransportes nötige Aldosteronfreisetzung wird unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen durch vermehrte AII-Konzentration in der Blutzirkulation vermittelt (2). Zur Regulierung der Aldosteronproduktion greift Angiotensin II an zwei Stellen der Biosynthese dieses Mineralkortikoides ein (73). Der erste Einfluß erfolgt in der Frühphase bei der Konversion von Cholesterol zu Pregnonolon. Diese Stelle wird durch AII, ACTH und K^+ stimuliert. Außerdem kann sich auch eine Anregung durch Prostaglandin, Serotonin u.a. ergeben. Die zweite Intervention findet in der sogenannte Spätphase der Biosynthese bei der Umwandlung von Corticosteron zu 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron statt. Diese Stelle wird durch Kaliumionen und/oder eine hohe AII-Konzentration stimuliert (141).

Aldosteron dringt durch einen reinen Diffusionsprozess in die Zelle ein, verbindet sich mit einem zytoplasmatischen Rezeptor und gelangt durch thermosensitive Prozesse in den Zellkern (12,48). Im Nukleus bindet sich der Hormon-Rezeptor-Komplex an die Akzeptoren des Chromatins und verursacht die RNS- und Proteinsynthese, deren Produkte den Aldosteroneffekt übertragen (81). Die Wechselwirkung von Aldosteron mit dem Zellkern beeinflußt die Gen-Ausstattung und veranlaßt die Synthese einer Gruppe Proteine, der sogenannten Aldosteron-induzierten Proteine (AIP) (Abb. 5). Diese Proteine bewirken weitere Zellreaktionen, wie die Synthese-Aktivierung von

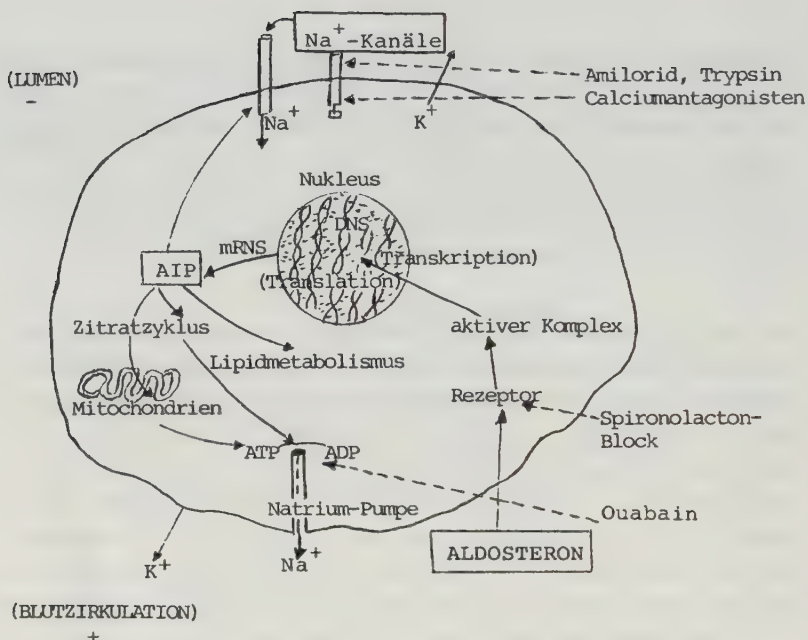


Abb. 5: Schematische Darstellung einer Aldosteron-Target-Zelle (z.B. dist. Tubuluszelle) unter dem Aspekt des Na^+ -Transportes. Das Aldosteron bindet sich an zytoplasmatische Rezeptoren und wirkt als aktiver Komplex auf Chromatin zur Bildung der Aldosteron-induzierten Proteine (AIP). AIP sind für alle intrazellulären physiologischen Effekte verantwortlich: Erhöhung der Na^+ -Permeabilität, Induzierung neuer Na^+ -Pumpen (K^+ , Na^+ -ATPase), Intensivierung der mitochondrialen Prozesse und des Lipidmetabolismus. Zusätzlich existieren Angriffspunkte einiger die Aldosteronwirkung blockierender pharmakologischer Substanzen (Spironolacton, Amilorid, Ouabain und Calciumantagonisten).

mitochondrialen Enzymen, die den Lipidmetabolismus steigern können. Aldosteron fördert die Synthese der nuklearen und zytoplasmatischen RNS. Diese Messenger-RNS übertragen die Aldosteronwirkung auf den Natriumionentransport. AIP beschleunigen separat und unabhängig den passiven Na^+ -Eintritt in die und den aktiven Na^+ -Austritt aus der Zelle. Wahrscheinlich sind die AIP als Trägerstoffe am aktiven Na^+ -Transport beteiligt. Die Stimulation des Na^+ -Transportes ist von der de novo Proteinsynthese abhängig (Synthese der Na^+, K^+ -ATPase). Die AIP unterstützen die oxydative Phosphorylierung, um die Natriumpumpe mit Energie zu beliefern (32,81). Die Natriumkanäle werden wahrscheinlich durch eine Methyl-Transfer-Reaktion und durch den zellulären Ca^{2+} -Strom reguliert. Die Methylierung der membrangebundenen Proteine oder Lipide spielt dabei eine Rolle (49).

2.1. Natriumionentransport

Das Aldosteron wird als ein potenter Regulator des Elektrolytmetabolismus angesehen. Die Zielorgane der hormonellen Wirkung sind die distalen Segmente der renalen Tubuli, die Harnblase, die Mukosa des Colon descendens sowie Speichel- und Schweißdrüsen. Aldosteron im Kreislauf, in einer Dosis von 1-10 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht, verursacht eine salidiuretische Wirkung und einen spezifischen Effekt auf die transmembranale Strömung von Na^+ und K^+ aus den glatten Muskelzellen (46). Aldosteron reguliert sowohl den aktiven Na^+ -Transport als auch die renale Na^+ -Retention.

Im allgemeinen gelangt ein Natriumion durch die Zellmembran in zwei aufeinanderfolgenden Prozessen, und zwar a) es diffundiert aus dem Lumen über einen apikalen Weg passiv in die Zelle hinein und wird b) durch spezifische und vom elektrischen Membranpotential abhängige Na^+ -Kanäle mittels der

basolateraler Natriumpumpe ($\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$) in den extrazellulären Raum gepumpt. Es handelt sich um eine Übertragung der Na^+ -Ionen entgegen dem Konzentrationsgradient und dem elektrochemischen Potentialgefälle sowie unter Energieaufwand durch die Membran hindurch. Dabei treten die angehäuften K^+ aus der Zellmembran in den interstitiellen Raum (103).

Aldosteron besitzt eigenständige Wirkung auf den Na^+ -Eintritt durch die apikale Zellmembran und den Na^+ -Austritt durch die basolaterale Zellmembran, wobei eine Beeinflussung der apikalen Na^+ -Permeabilität und der basolateralen Na^+ -Pumpe entsteht. Die Förderung des Na^+ -Übertritts in die Zellen erfolgt durch eine Vermehrung der apikalen Kanäle oder durch die Beschleunigung der Diffusionsprozesse. Die Steigerung des Na^+ -Austritts wird durch eine größere Dichte und durch eine zu Na^+ -Ionen höhere Affinität der basolateralen Pumpen bedingt. Die Bildung neuer Natriumkanäle und der Synthese der $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ wird vom Aldosteron intensiviert (51).

Die Aldosteron-induzierte Stimulierung mitochondrialer Enzyme, insbesondere des Citratcyclus, verläuft gleichzeitig mit der Aktivierung des Na^+ -Transportes. Die Anregung der mitochondrialen oxydativen Phosphorylierung erhöht das Verhältnis von ATP:ADP und bewirkt den Na^+-K^+ -Austausch (34). Aldosteron modifiziert die Lipidzusammensetzung in den Zellmembranen und induziert eine Dephosphorylierung der zytoplasmatischen und membrangebundenen Proteine. Ein weiterer Effekt von Aldosteron auf den Lipidmetabolismus umfaßt die Stimulation der Fettsäuresynthese sowie des Phosphatidmetabolismus (49).

2.2. Steuerung der Aldosteronaktivität

Die unter verschiedenen pathophysiologischen Zustände erhöhte Aldosteronproduktion, bekannt mit dem Sammelbegriff 'primärer

und sekundärer Hyperaldosteronismus', bildet ein breites Feld mit vielen offenen Fragen für die Forschung. Tabelle II enthält eine Übersicht über die diätetischen und pharmakologischen Mittel, die klinisch oder experimentell in verschiedenen Stufen die Aldosteronsekretion, den Natriumtransport oder das Angebot an spezifischen Aldosteronrezeptoren beeinflussen können. Eine Verschiebung des pH im Organismus nach der sauren Seite hin stellt einen Stimulus zur Aldosteronproduktion dar (69). Während die Hyponatriämie zur Anregung der Aldosteronsekretion führt, wirken ihr die natriumbalancierenden Faktoren entgegen. Der Ausgleich des hyponatriämischen Zustandes, z.B. durch Natriumbicarbonicum, hemmt die Aldosteronfreisetzung (26). Eine Reihe von Aldosteronhemmern intensivieren in verschiedenem Grad die Na^+ -Rückresorption in den distalen Tubuli der Nieren, wie die Osmodiuretika, greifen in den Na^+ -Transport durch die Natriumkanäle ein, wie Amilorid, Trypsin, Calciumantagonisten, oder besetzen kompetitiv die spezifischen Aldosteronrezeptoren, wie Spirolactone (81). Dadurch bleibt die Natriumbalance im Organismus positiv. Obwohl die Aldosteroninhibitoren keine direkten Effekte auf die hypophysäre ACTH-Sekretion ausüben, verursachen sie oft eine Zunahme der ACTH-Konzentration im Plasma als kompensatorisches Phänomen bei der Suppression der Aldosteronsynthese in der Nebennierenrinde.

Die Aldosteronsekretion steht unter einer direkten dopaminergen Kontrolle. Das Neurotransmitter - Dopamin - befindet sich in der Nebennierenrinde und versorgt sie mit einer maximal tonischen Inhibition auf die Aldosteronbildung, die ihrerseits vom Zustand der Natriumbalance abhängig ist. Dopamin inhibiert die Angiotensin-induzierte Aldosteronsekretion während der Natriumdepletion und bei aufrechter Körperhaltung, d.h. die Dopaminaktivität ist vom Natriumstatus abhängig (129). Die durch Furosemid stimulierte Al-

TABELLE II: Substanzen, die mit der Aldosteronbiosynthese oder Aldosteronwirkung interferieren

A. Mittel zur Hemmung:	B. Mittel zur Anregung:
(Ref)	(Ref)
Natrium-Überschuß (NaHCO_3) (26)	Natrium-Mangeldiät (2)
Chloridmangel (Salzarme Diät) (95)	Chlorid-Überfülle (NH_4Cl) (9)
Spirolactone (93)	metabolische Acidosis (28,69)
Dopamin-Agonisten (Bromocriptin) (128)	Kalium-Zufluß (95)
(Apomorphin)	Diuretika (140)
Cyclamidin-Derivate (Triamteren, Amilorid) (49)	Dopamin-Antagonisten (Metoclopramid) (135,137, (Haloperidol) 139)
AI-converting Enzym-Inhibitoren (126)	Met-Enkephalin-Analogue (78)
Angiotensin-Antagonisten (41)	Prostaglandin-Derivate (36)
Calcium-Antagonisten (136)	Phospholipase A_2 (71)
Osmodiuretika (Mannit, Sorbit) (121)	Proteinreiche Diät (102)
Cyclooxygenase-Inhibitoren (Prostaglandinsynthese-hemmer) (24,105)	Arachidonsäure (52)
Heparin und Heparinoide (132)	Angiotensin-Agonisten (41)
Ouabain (43)	Parasympathomimetika (Carbachol) (72)
Serotonin ₂ -Antagonisten (Ketanserin) (112)	Natrium-Ionophoren (Amphotericin B, Methionin) (81)
Phospholipase A_2 -Hemmer (Mepacrin) (71)	
Benzodiazepine (Diazepam) (125)	
Histamin ₁ -Antagonisten (Cyproheptadin) (54)	
Imidazol-Derivate (Ketoconazol) (106)	
Trypsin (49)	

dosteronsekretion wurde durch Verabreichung des Dopamin- Agonisten - Bromocriptin - vermindert (128). Weiterhin, wurde festgestellt, daß die Dopamininfusion bei primärem Hyperaldosteronismus und bei Hypertension mit niedriger Plasma-Renin-Aktivität die Aldosteronwirkung vermindert. (138).

Die Suche nach effektiven Aldosteron-Inhibitoren hierfür - Angiotensin-Antagonisten rücken neuerdings in den Vordergrund der Diskussion - erfordert weitere Experimente und Analysen.

C. AUFGABENSTELLUNG

In der vorliegenden Studie soll dem Einfluß verschiedener Angiotensin I-, II- und III-Analogue auf die Bindung an spezifische Rezeptoren in der glatten Muskulatur und der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde nachgegangen werden. Weiterhin soll der Effekt dieser Analogue auf die Aldosteronfreisetzung aus den Glomerulosazellen untersucht werden.

Die Fähigkeit verschiedener Angiotensin-Analogue, die Aldosteronantwort zu modifizieren, gibt Anlaß, folgende Fragen zu stellen.

- a) Welche Zusammenhänge bestehen zwischen der Rezeptorbindungsaffinität und der Aldosteronproduktion durch Angiotensin-Analogue?
- b) Welche Angiotensin II-Antagonisten könnten als Pharmaka klinisch gegen den sekundären Hyperaldosteronismus Anwendung finden?
- c) Welches Ausmaß besitzt der mitwirkende agonistische Effekt der Angiotensin-Antagonisten auf die Aldosteronfreisetzung?
- d) Welche Angiotensinmetabolite und Analogue, die eine milde Steigerung der Aldosteronproduktion auslösen, könnten klinisch als blutdrucksenkende Pharmaka eingesetzt werden?
- e) Welche Rolle spielen die Dekapeptide, wie AI und seine Analogue, sowie der Nonapeptidmetabolit bei der Stimulation der Aldosteronproduktion?

Außerdem werden quantitative und qualitative Vergleiche zwischen der Rezeptorbindungsaffinität der Angiotensin II- und der Angiotensin III-Analoga in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde und der glatten Muskulatur an- gestellt.

Zur Diskussion steht dabei auch die Verwendbarkeit der Angiotensin-Analoga bei der Kontrolle der GFR und der Natriumretention sowie bei sekundärem Hyperaldosteronismus, wie z.B. bei chronischer Herzinsuffizienz und selektierten Fällen mit renovaskulärer Hypertonie.

Die Erforschung des Angiotensin-Aldosteron-Mechanismus richtet sich auf bestimmte Ansatzpunkte innerhalb des Reaktionsablaufs. Dabei werden folgende Untersuchungen vorgenommen: Bestimmung des Rezeptorbindungspotentials von 19 Angiotensinverbindungen mit Hilfe einer radio- logischen Methodik durch die Inhibition der Rezeptor- bindung von ¹²⁵Jod-markiertem Angiotensin II; Messung des Aldosteron-stimulierenden Effektes dieser Peptide mit Hilfe eines radioimmunologischen Instrumen- tariums.

D. MATERIAL UND METHODEN

I. Material

Es kamen 19 Angiotensinverbindungen, die in der Cleveland Clinic Research Foundation nach dem Merrifield Solid Phase Verfahren (87) synthetisiert wurden, in dieser Experimentenserie zur Anwendung:

A. Dekapeptide: $[\text{Ile}^5]_{\text{AI}}$; $[\text{Val}^5, \text{Ser}^9]_{\text{AI}}$;

B. Nonapeptid: $\text{Des-Asp}^1[\text{Ile}^5]_{\text{AI}}$;

C. Oktapeptide:

(a) $[\text{Ile}^5]_{\text{AII}}$; $[\text{Val}^5]_{\text{AII}}$;

(b) $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^5]_{\text{AII}}$; $[\text{Me}_2\text{Gly}^1, \text{Ile}^5]_{\text{AII}}$

(c) $[\text{Sar}^1, \text{Ala}^8]_{\text{AII}}$ ("Saralasin"); $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]_{\text{AII}}$;

$[\text{Sar}^1, \text{Ser}^8]_{\text{AII}}$; $[\text{Sar}^1, \text{Thr}^3]_{\text{AII}}$; $[\text{Sar}^1, \text{Thr}(\text{Me})^8]_{\text{AII}}$;

D. Heptapeptide:

(a) $\text{Des-Asp}^1[\text{Ile}^5]_{\text{AII}}$ (AIII);

$\text{Des-Asp}^1[\text{Val}^5]_{\text{AII}}$ ($[\text{Val}^4]_{\text{AIII}}$);

(b) $\text{Des-Asp}^1[\text{Ala}^8]_{\text{AII}}$ ($[\text{Ala}^7]_{\text{AIII}}$);

$\text{Des-Asp}^1[\text{Ile}^8]_{\text{AII}}$ ($[\text{Ile}^7]_{\text{AIII}}$);

$\text{Des-Asp}^1[\text{Ser}^8]_{\text{AII}}$ ($[\text{Ser}^7]_{\text{AIII}}$);

$\text{Des-Asp}^1[\text{Thr}^8]_{\text{AII}}$ ($[\text{Thr}^7]_{\text{AIII}}$);

$\text{Des-Asp}^1[\text{Thr}(\text{Me})^8]_{\text{AII}}$ ($[\text{Thr}(\text{Me})^7]_{\text{AIII}}$).

Einzelheiten bezüglich der Peptidcharakteristik finden sich bei Bumpus und Khosla (19,20,66-68). Die Reinheit dieser Angiotensinderivate wurde mittels Dünnschichtchromatographie, Elektrophorese (bei pH 2 und 8,2) und Aminosäurenanalyse überprüft. Die Standardlösungen wurden als äquimolare Portionen

in physiologischer Kochsalzlösung in unterschiedlichen Konzentrationen von 10-100 mg/ml vorbereitet und eingefroren. Für radiologische Rezeptorbindungs-Studien stand ^{125}J -Angiotensin II (New England Nuclear Corp., Boston, MA) mit spezifischer Aktivität von 800-1000 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ zur Verfügung.

Die Untersuchungen umfaßten ca. 750 Sprague-Dawley-Ratten, geliefert von Zivic Miller (Pittsburgh, PA), beiderlei Geschlechts, 3 Monate alt und mit einem Körpergewicht von 220-250 g. Sie wurden in Gruppen von 30-50 Tieren untersucht. Vor dem Experiment erhielten sie jeweils drei Tage Standardnahrung mit normalem Natrium- (0,3%) und Kalium- (0,8%) Gehalt. Sie wurden durch die Guillotine getötet. Die Nebennieren wurden in Medium 199 (Gibco, Formula # 78-5492, Grand Island Biological Corp., Grand Island, NY) kalt gehalten, die Uteri von weiblichen Tieren ebenfalls in Medium 199 gesammelt.

II. Methoden

1. Studium der Angiotensin-Rezeptorbindung

1.1. Präparation der subzellulären Fraktion der glatten Muskulatur

Die Uterusmuskulatur wurde als Äquivalent für die glatte Gefäßmuskulatur benutzt (115). Zuerst wurden die Myometrium-Uteri aus den Ratten herauspräpariert und die Serosa abgestreift, gesammelt und in dem kalten Medium 199 bei 4°C , pH 7,4 fein geschnitten. Die Homogenisation der Gewebe erfolgte mit einem Polytron (Kinematica PT 10-20, Kinematics Corp., Barrington, IL) in 4 sek. Der Homogenisationspuffer enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 mit 150 mM NaCl und 5 mM Na-EDTA (Na-Salz von Äthylendiamintetraessigsäure). Das Ho-

mogenat wurde durch Nylongaze filtriert und 40 min bei 600 x g zentrifugiert. Die 700-20.000 x g Fraktion wurde für das Bindungsstudium in einer Konzentration von 100-200 µg Rezeptorprotein pro Inkubationsröhrchen für radiologische Bestimmungen verwendet.

II.1.2. Präparation der subzellulären Fraktion der Glomerulosazellen

Die zweite Versuchsexposition begann mit der Entfernung der Nebennieren aus den Ratten. Diese Organe wurden von Fettgewebe befreit und in dem kalten Medium 199 gesammelt. Dem Medium waren noch 2 mg Dextrose pro ml, 10 mM Hepes-Puffer und 5 mg BSA (Rindenserumalbumin) pro ml beigelegt. Die Nebennierenkapseln wurden durch einen Messerschnitt geöffnet, manuell ausgepreßt bis auf die innere Zellschicht Zona glomerulosa. Dieses Gewebe wurde fein geschnitten und mit einem Teflonglashomogenisator in 20 mM Natriumbikarbonat, 9 ml für 30 Kapseln, homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Nylongaze filtriert und 20 min bei 600 x g zentrifugiert. Die 10.000-100.000 x g Fraktion wurde für das Rezeptorbindungsstudium benutzt, wobei 100-200 µg Rezeptorprotein pro Inkubationsröhrchen verwendet wurden.

II.1.3. Vorgang der Rezeptorbindung

Beide Gewebsarten werden in 50 mM Tris-HCl-Puffer mit pH 7.4, 120 mM NaCl, 5 mM Dithiothreitol und 1% RSA inkubiert. Zu jeder Probe kamen 30-70 pg ^{125}J -Angiotensin II hinzu. Das Meßvolumen in den Inkubationsröhrchen betrug 300 µl. Zur Prüfung von ^{125}J -AII wurden die vorbereiteten Angiotensinverbindungen in Konzentrationen zwischen 10^{-10} - 10^{-8} M beigelegt. Die Inkubationszeit dauerte für die Proben mit der glatten Muskulatur

30 min bei 22°C und für die Glomerulosazellen 60 min bei 22°C, in der die Rezeptorbindung stattfand. Blankproben wurden zur Differenzierung nichtspezifischer Bindungen und zur Korrektur der Werte nebenher geführt. Die Separation der gebundenen von den freien Hormonen erfolgte durch die Millipore-Filtration (Nitrozellulosefilter HAWP, 0,45 µm; Millipore Corp., Bedford, MA). Die Filterproben in Polyäthylen-Fläschchen wurden in einem Gammazähler (Searle Radiographics Inc., Des Plaines, IL) gemessen.

II.1.4. Auswertung der Daten der Rezeptorbindung

Die Rezeptorbindung wurde als Verhältnis der Anzahl von Bindungen der getesteten Liganden zu der Anzahl von Bindungen ohne Liganden gewertet (B/B_0). Die Rezeptoraffinität jedes Angiotensin-Analoges stellt ein Verhältnis aus der Konzentration des Angiotensin II und der Konzentration des Analoges dar. Die Konzentration, welche ^{125}J -Angiotensin II aus seinen Rezeptoren verdrängt, wurde in halber Größe gewertet (50%, ED_{50}).

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d wurden aus der Scatchard-Analyse(109) errechnet. Der Dosisquotient wurde durch die Division K_d -Angiotensin II : K_d -AII-Analogen ermittelt. Nach dem Massenwirkungsgesetz wandten wir folgenden Gleichungen an:

$$H + R \xrightleftharpoons[K_{-1}]{} HR \quad \text{und} \quad K = \frac{(H - R)}{(H)(R)} \quad (I)$$

H = Hormon; K_1 = Assoziationskonstante (K_a);
 R = Rezeptor; K_{-1} = Dissoziationskonstante (K_d);

$$K_a = \frac{K_1}{K_{-1}} ; \quad K_d = \frac{K_{-1}}{K_1} \quad (\text{II})$$

Es wird angenommen, daß bei einer spezifischen Rezeptorbindung eine komplette Saturation der Rezeptoren stattfindet. Die totale Rezeptorkonzentration (R_t) bzw. totale Hormonkonzentration (H_t) werden folgendermaßen ausgedrückt:

$$R_t = HR + R; \quad \text{und gleichfalls} \quad H_t = HR + R \quad (\text{III})$$

Die fraktionelle Saturation (Y), d.h. die Fraktion der maximalen Ligandenbindung ist:

$$Y = HR/R_t \quad (\text{IV})$$

und der Prozentsatz der freien Rezeptoren ist:

$$(1 - Y) = R/R_t, \quad (\text{V})$$

daraus ergibt sich folgende Gleichung:

$$H R = Y R_t \quad \text{sowie} \quad R = (1 - Y) R_t. \quad (\text{VI})$$

Bei dem Verhältnis Assoziation zu Dissoziation ergibt sich daher:

$$K_1 H R = K_{-1} H R \quad (\text{VII})$$

und bei der Substitution:

$$K_1 Y R_t = K_{-1} H (1 - Y) R_t \quad (\text{VIII})$$

$$\text{oder} \quad K_1 Y = K_{-1} H (1 - Y). \quad (\text{VIIIa})$$

Weil $K_a = \frac{K_1}{K_{-1}}$ (vergl. II), kann die Formel VIIIa umformuliert werden zu:

$$Y = \frac{K_a H}{1 + K_a H} \quad (IX)$$

Wenn K_d anstatt K_a angewandt wird, folgt:

$$Y = \frac{H}{K_d + H} \quad (X)$$

was eine andere Form der Michaelis-Menten-Gleichung darstellt:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{S}{K_m + S}$$

$$\text{Weil } Y = \frac{1}{K_m + H} = \frac{H R}{R_t}, \text{ so folgt:}$$

$$H R (K_d + H) = H R_t \quad (XI)$$

$$\text{oder } H R K_d = -H R \cdot H R_t \quad (XII)$$

und dividiert durch $(H K_d)$ folgt:

$$\frac{H R}{H} = -\frac{1}{K_d} \cdot H R + \frac{R_t}{K_d} \quad (XIII)$$

Das ergibt die Scatchard-Graphik, wenn $\frac{H R}{H}$ gegen $H R$ gezeichnet ist. Steigung der Geraden (Steigungswinkel) ist $= \frac{1}{K_d} = -K_a$, und die gesuchte Größe (x) ist = Ordinatenschnittpunkt R_t .

Bedingungen für diese Graphik sind: (a) gleichartige Rezeptoren, (b) nonkooperative Stellen und (c) keine Interaktionen mit anderen Hormonen.

Die statistische Verarbeitung der Daten erfolgte durch die Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen. Die

statistische Signifikanz wurde mittels paarigen Student-Testes für den Vergleich der Rezeptorbindungskonstanten und mittels unpaarigen Testes für andere Vergleiche errechnet.

II.2. Aldosteronbestimmung

2.1. Herstellung einer Suspension aus Glomerulosa- zellen der Nebennierenrinde

Die Nebennieren von 30 Ratten wurden, wie bereits in II.1.2. dieses Kapitels beschrieben, von adherenten Geweben befreit, im Medium 199 bei 4°C aufbewahrt und nach einem Einschnitt vorsichtig manuell und unter Verwendung von Zellstoff ausgepresst, um eine Verschmutzung durch Gewebe aus der Zona fasciculata-reticularis oder durch Nebennierenmark zu vermeiden. Nach der Auswaschung mit dem K⁺-freien Medium 199 und der Zerkleinerung erfolgte die Dispersion der Glomerulosazellen mit Hilfe einer Enzymverdauungsmethode. Das Gewebe wurde mit dem Zusatz von Kollagenase (Worthington Biochem. Corp., Freehold, NJ) von 3,7 mg/ml, DNase (Desoxyribonuklease) (Sygma, St. Louis, MO) von 10 mg/ml sowie Dextrose 20 mg/ml bei 37°C 15 min in automatisch schüttelndem Wasserbad inkubiert. Um die Dispersion zu unterstützen und die lebenden Zellen zu optimieren, wurde das Inkubationsgemisch in Portionen mechanisch mittels einer Plastikspritze mit einem langen Plastikröhrchen herumgewirbelt, wobei Medium 199 sowie 2 mg/ml RSA, 3,5 mM KCl und 0,5 mg/ml DNS (Desoxyribonukleinsäure) hinzugegeben wurden. In 15 min war eine klare Suspension erreicht. Mit der Zentrifuge bei 100 x g, 22°C und 15 min Zeitdauer wurden die Zellen sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment wieder im Medium 199 mit 2 mg/ml RSA und 5 mM KCl gelöst.

Die isolierten lebenden Zellen wurden mikroskopisch gezählt. Das sensitive Zellsystem wurde verwendbar, wenn die Zählung

100.000-150.000 Zellen/ml ergab. Diese Zellsuspension wurde zur Untersuchung der Aldosteronproduktion durch verschiedenen Konzentrationen von Angiotensin verwendet.

II.2.2. Inkubation der Zellsuspension mit Peptiden

Zellsuspensionsaliquoten zu 1 ml in Inkubationsröhrchen mit äquimolaren Konzentrationen der untersuchten Peptiden in einer Dosis 10^{-10} - 10^{-8} M wurden bei 37°C unter Gasstrom von 95% O₂ und 5% CO₂ zwei Stunden inkubiert. Dabei wurde jede Dosis eines Angiotensin-Analoges in der Untersuchung dreifach getestet. Nach der Inkubation erfolgte die Sedimentierung der Zellen durch Zentrifugierung bei 1500 x g in 15 min. Der Überstand wurde zur Aldosteronbestimmung durch RIA gemessen. Alle Peptide verglichen wir gleichzeitig mit der Aktivität von Angiotensin II als Referenzstandard. In die weitere Auswertung gelangten die Peptidekonzentrationen, die die Aldosteronproduktion halbmaximal (ED₅₀) stimulierten.

II.2.3. Vorgang der Aldosteronbestimmung

Das kristallische d-Aldosteron (Sigma) wurde im Alkohol 200 ng/ml portioniert und im Gefriererraum gelagert. Davon wurde jeweils eine Standardkurve mit 10-500 pg ausgeführt. Weiterhin wurden verwendet: a) markiertes 1,2-³H-Aldosteron (New England Nuclear Corp., Boston, MA), woraus ex tempore eine Verdünnung von 20.000 cpm/0,5 ml RIA-Phosphatpuffer vorbereitet wurde; b) Aldosteron-Antiserum-18-21-Disuccinat-RSA (NIH Hormone Distribution Committee, USA) in einer $1,5 \times 10^6$ -Lösung (1:500.000).

Bestimmungsverfahren: Jede einzelne Probe sowie die Aldosteronstandardlösung wurden in Aliquoten zu 10, 15 und 25 µl in

Polypropylen-Inkubationsröhrchen von 12 x 75 mm Größe gebracht, mit 0,5 ml 0,1 Phosphatpuffer (Dulbeccos), pH 7,4 , mit 8 g NaCl/l und 1 g/ml Rindengammaglobulin (Sigma) verdünnt. Dazu kam mit Hilfe eines Diluters (LKB-Bromma 2075) 0,05 ml ^3H -Aldosteron und 0,05 ml Antiserum. Der Röhrchen-satz wurde über Nacht, 18 Std, bei 4°C kühl gehalten.

Die Trennung des gebundenen und ungebundenen Aldosteronsführten wir danach mit Zugabe von 1,4 ml gesättigten Ammoniumsulfat durch. Es folgte eine Zentrifugierung der Proben bei 4°C, 1500 x g, 15 min Zeitdauer. Der Überstand wurde in Szintillationsgläschen umgefüllt und mit 10 ml Toluol-Szintillator (Spectrofluor, Amersham/Searle) vermischt (133). Die Szintillationslösung hatte folgende Zusammensetzung: 19 g PPO (2,5-Diphenyloxazol), 0,95 g POPOP (2,2'-1,4-Phenyl-bis-5-phenyloxazol), ad 10 l Toluol. Die Szintillationsmessungen des Fläschcheninhaltes führte das Beckman-Liquid-Szintillation-Spektrometer, Modell LS 250, aus.

Die Gültigkeit der direkten RIA des Aldosterons wurde durch Vergleich mit den Werten nachgewiesen, die durch die Methylenchloridextraktion oder durch die Reinigung mittels Säulenchromatographie mit Sephadex LH 20 ermittelt wurden (134).

II.2.4. Auswertung der RIA-Daten der Aldosteronmessung

Die Auswertung der Daten des RIA wurde mittels der Kurve der Standarddosis vorgenommen. Die Besonderheiten dieser kurven-graphischen Darstellung zum Messen liegen darin, daß wegen des sigmoidalen Charakters der Standardkurve die Übertragung einer großen Menge von Daten in ein Computersystem nicht möglich ist. Das Hauptproblem der Auswertung stellt sich im Mangel an Linearität sowie in der Gleichmäßigkeit der peripheren Werte bei der Gaußschen Verteilung. Eine Lösung zur Auswertung

der RIA-Daten bildet deshalb die Logit-Transformation, 1968 eingeführt von Rodbard et al. (113, 114), die sowohl bei den Kurvenzeichnungen als auch für die lineare Regressionsrechnung anwendbar ist. Die Loglog-Transformation bewährt sich bei der Auswertung eines großen Datenangebotes und seiner Computerisierung. Die Loglog-Transformation des Verhältnisses B/B_0 ist folgendermaßen definiert:

$$\text{Loglog } B/B_0 = \ln \frac{B/B_0}{1 - B/B_0}$$

Die Kurve wird manuell gezeichnet. Die Dosis-Reaktionskurve wird durch folgende Formel gekennzeichnet:

$$\text{Logit } Y = \ln = a + b \ln x$$

$$\text{oder } \text{Logit } Y = \ln \frac{Y}{1 - Y}$$

$$Y = B/B_0;$$

x = Konzentration des unmarkierten untersuchten Aldosterons;

a = Y - axialer Wertebereich der Logit - $\ln$;

b = Steigung der Geraden der Logit - $\ln$;

B = Menge markiertes Aldosteron, gebunden an spezifische Antikörper;

B_0 = Menge markiertes Aldosteron, gebunden an spezifische Antikörper ohne untersuchte Antikörper;

B und B_0 wurden von nichtspezifischen Bindungen mittels Blankproben korrigiert ($B\text{-NS}/B_0\text{-NS}$).

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Antigen-Antikörper-Kopplung wurde die Scatchard-Analyse benutzt (II.1.4. dieses Kapitels). Die Ergebnisse der Aldosteronmessung wurden mit dem Computer (Monroe 325 Scientist) nach einem Programm (MKAB) mit verschiedenen gleichungslösenden Fähigkeiten ausgewertet. Alle Kurvengraphiken und Kalkulationen wurden auf Grund der Loglog-Transformation der Standardkurven ausgeführt. Zur Signifikanzprüfung der Daten kam der Student-t-

Test in Anwendung.

II.2.5. Vergleich der agonistischen Eigenschaften von Angiotensin-Antagonisten

Bestimmte, feststehende Dosiskonzentrationen von Angiotensin-Antagonisten wurden mit variierenden Konzentrationen von Angiotensin II in isolierten Glomerulosazellen kombiniert. Die Vorbereitung des Zellsystemserfolgte, wie in II.2.1. dieses Kapitels, die zweistündige Inkubation, wie in II.2.2., sowie die Aldosteronbestimmung, wie in II.2.3., beschrieben.

Die Werte der Antwortreaktion wurden in einem Koordinaten System nach Lineweaver-Burk (76) dargestellt: von Aldosteron auf der Ordinate, von den untersuchten Antagonisten auf der Abszisse. Die gewonnenen Linien wurden nach folgender Funktionsgleichung errechnet:

$$\frac{1}{A} = \frac{K_d}{A_{\max}} \cdot \frac{1}{x} + \frac{K_d}{A_{\max}}$$

A = Aldosteronproduktion;

A_{max} = maximale Aldosteronproduktion;

K_d = Dissoziationskonstante des Agonist-Rezeptor-komplexes;

x = Konzentration von Angiotensin II.

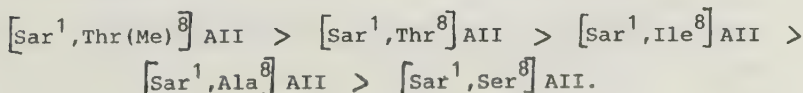
E. ERGEBNISSE

1. Rezeptorbindungsstudium

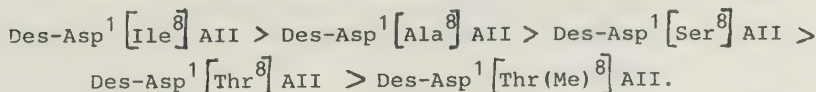
Die Ergebnisse dieser Studien repräsentieren das Ausmaß der Rezeptorbindungsaffinität einer Reihe von Angiotensin-Analogen auf die glatte Muskulatur und die Glomerulosazellen der Nebennierenrinde. Die Verdrängungsfähigkeit der Angiotensin-Analoge beim Bindungsvorgang gegenüber ^{125}J -markiertem Angiotensin II wird als Kriterium ihrer Rezeptorbindungsfähigkeit gewertet.

1.1. Glatte Muskulatur

Die Rezeptorbindungsfähigkeit von Angiotensin II, Angiotensin III (Des-Asp¹-AII) sowie der AII- und AIII-Analoge wurde an der Rezeptorbindung der glatten Muskulatur untersucht. Die K_d von AII betrug bei diesen Untersuchungen $6,8 \times 10^{-9}$ M, während AIII mit K_d $4,3 \times 10^{-8}$ M weniger leistungsfähig war. Abbildung 6 demonstriert die Rezeptoraffinität von AII- und AIII-Analogen, wobei die Oktapeptide höhere Werte der Bindungspotenz zu Rezeptoren als die Heptapeptide besaßen. Bei den Oktapeptiden ergab sich folgende Reihe:



Die Reihenfolge der Heptapeptide war:



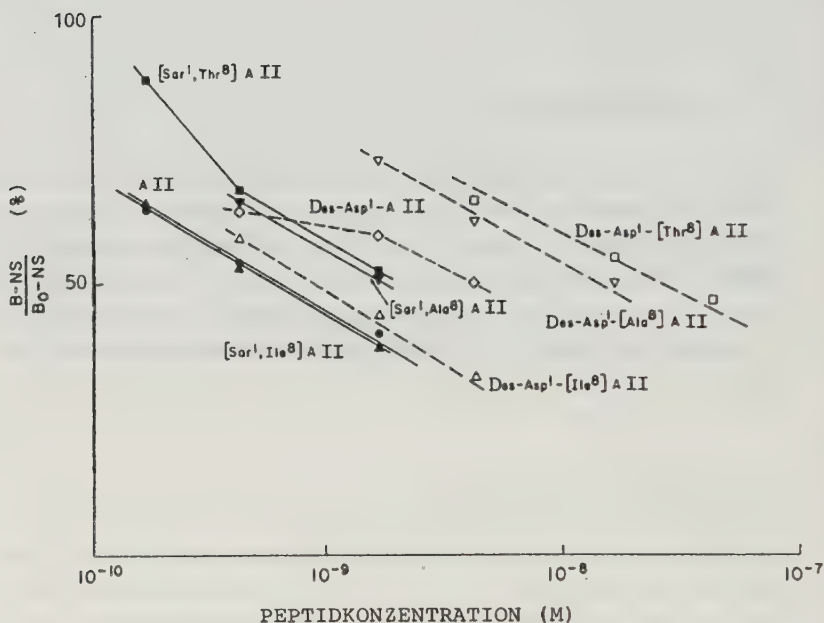


Abb. 6: Das Inhibitionspotential der Oktapeptide (—): Angiotensin II (AII) (●), $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]$ AII (▲), $[\text{Sar}^1, \text{Ala}^8]$ AII (◄) und $[\text{Sar}^1, \text{Thr}^8]$ AII (■) sowie Heptapeptide (---): Angiotensin III (AIII) (◇), $\text{Des-Asp}^1[\text{Ile}^8]$ AII (△), $\text{Des-Asp}^1[\text{Ala}^8]$ AII (◁) und $\text{Des-Asp}^1[\text{Thr}^8]$ AII (□) in der glatten Uterusmuskulatur gegen die Bindungsfähigkeit von ^{125}J -markiertem Angiotensin II (70 pg). Die Punkte im Diagramm repräsentieren den Mittelwert der Dreifachbestimmung jedes Einzelexperimentes. Bei der Auswertung der Daten wurde die Loglog-Transformation angewandt.

Die einzelnen K_d -Werte dieser Peptide sind in Tabellen III und IV enthalten und werden mit den Werten der Rezeptorbindung in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde verglichen.

Bei drei Analogon mit stärkerem Bindungspotential als AII war eine Substitution der Asparaginsäure durch Sarcosin in der 1. Position der Aminosäuresequenz' des AII erfolgt. Dabei erschien die Bindungsfähigkeit des Angiotensin II-Analoges $[\text{Sar}^1, \text{Thr}(\text{Me})^8]\text{AII}$ am ausgeprägtesten, und übersteigt zusammen mit $[\text{Sar}^1, \text{Thr}^8]\text{AII}$ und $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{AII}$ die Rezeptorbindungsfähigkeit von AII.

Der Wegfall der Substitution der 1. Position in der Peptidkette von AII wird mit einem variablen Verlust an Bindungseigenschaften bei dieser Gruppe von AIII-Analogen begleitet. Des- $\text{Asp}^1[\text{Ile}^8]\text{AII}$ wies nur 59% des Bindungspotentials seines Oktapeptidäquivalenten $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{AII}$ auf. Ein signifikant hoher Verlust an Bindungsfähigkeit wurde auch bei Des- $\text{Asp}^1 \text{Thr}^8 \text{AII}$ beobachtet, das nur 6,3% der Bindungsfähigkeit von seinem äquivalenten Oktapeptid $[\text{Sar}^1, \text{Thr}^8]\text{AII}$ behielt. Desgleichen verminderten sich die Bindungseigenschaften von Des- $\text{Asp}^1[\text{Ala}^8]\text{AII}$ auf 11,2% seines korrespondierenden Oktapeptides $[\text{Sar}^1, \text{Ala}^8]\text{AII}$.

1.2. Zona glomerulosa der Nebennierenrinde

Wiederholte Untersuchungen an Glomerulosazellen der Nebennierenrinde jedes einzelnen Angiotensinanalogen brachten ähnliche Resultaten spezifischer Rezeptorbindungen. Abbildung 7 demonstriert das Rezeptorbindungspotential von menschlichem $[\text{Ile}^5]\text{Angiotensin II}$ im Vergleich mit zwei seiner Analoge, worin die Asparaginsäure in 1. Position mit einem Methylglycin (Sarcosin) bzw. Dimethylglycin (Me_2Gly^1) ausgetauscht wurde. In sechs Experimenten mit dreifacher Bestim-

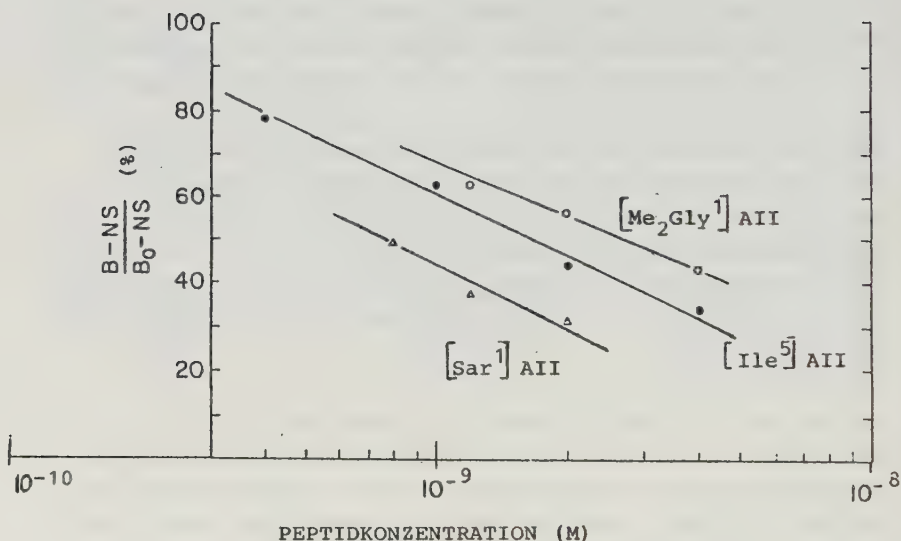


Abb. 7: Die Rezeptorbindungsfähigkeit von Ile⁵-Angiotensin II (●) und seinen Analogen Sarcosin¹-AII (MeGly¹-AII) (Δ) und Dimethylglycin¹-AII (Me₂Gly¹-AII) (○) auf Plasmamembranen der Glomerulosazellen der Nebennierenrinde. Die Messung erfolgte durch die Inhibition der Bindung von 30 pg ¹²⁵J-markiertem Angiotensin II an seine spezifischen Rezeptoren durch o.g. AII-Analoge. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert einer dreifachen Bestimmung jedes Experimentes.

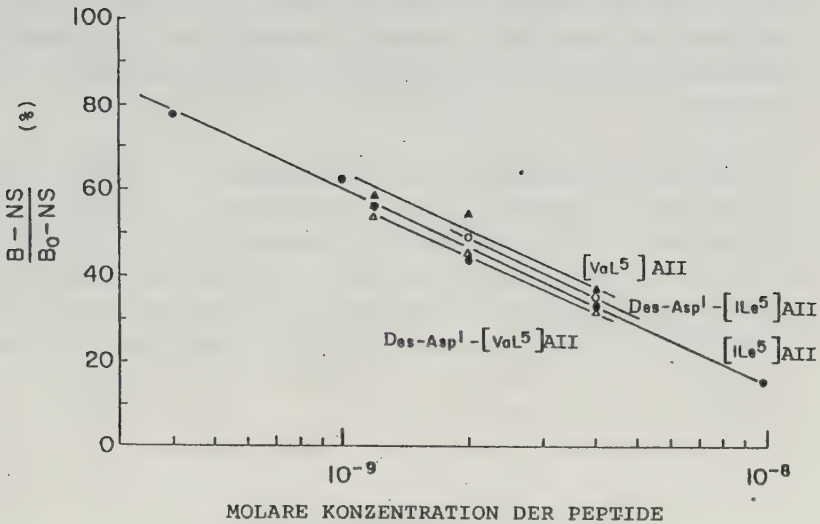


Abb. 8: Darstellung der Bindungspotenz des menschlichen Angiotensin II (Ile⁵-AII) (●) und seines Analoges [Val⁵] AII (▲). Beide physiologischen Oktapeptide werden mit ihren Metaboliten, den Heptapeptiden Des-Asp¹[Ile⁵] AII (Angiotensin III) (○) und Des-Asp¹[Val⁵] AII (Δ), in bezug auf ihre Rezeptorbindungsfähigkeit in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde verglichen. Die Messung erfolgte durch die Hemmung der Rezeptorbindung von 30 pg ¹²⁵J-markierte Angiotensin II. Jeder Punkt bedeutet den Mittelwert der dreifachen Bestimmung der einzelnen Experimente. Es wurde die Loglog-Transformation angewandt.

mung wurde gefunden, daß $[\text{Me}_2\text{Gly}^1]\text{AII}$ $69 \pm 2,9\%$ und $\text{Sar}^1\text{-AII}$ $207 \pm 16\%$ der Rezeptorbindungsfähigkeit des physiologisch aktiven Angiotensins II besaßen. Sarcosin¹-AII, d.h. $\text{MeGly}^1\text{-AII}$ war also dreimal leistungsfähiger zu binden als das $\text{Me}_2\text{Gly}^1\text{-AII}$ -Analogon.

Die Rezeptorbindungspotenz von Angiotensin II und III sowie seines Valin⁵-Analogon in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde ist in Abbildung 8 dargestellt. Valin⁵-AII zeigte $69 \pm 16\%$ der Rezeptoraffinität von Isoleucin⁵-AII. Die beiden mit ihnen korrespondierenden Heptapeptide Des-Asp¹[Ile⁵]AII und Des-Asp¹[Val⁵]AII inhibierten die Rezeptorbindung des ^{125}Jod -Angiotensin II in einem Grad von $72 \pm 9\%$ bzw. $92 \pm 11\%$ ($n = 3$).

1.2.1. Angiotensin I und Verwandte

Im Gegensatz zu den Bindungseigenschaften von Angiotensin II zeigten das Dekapeptid Angiotensin I sowie sein Analogon $[\text{Val}^5, \text{Ser}^9]\text{AI}$ und sein Metabolit, das Nonapeptid Des-Asp¹-Ile⁵-AI, ein sehr niedriges Bindungsvermögen. Abbildung 9 veranschaulicht das Rezeptorbindungspotential von Ile⁵ AI, das im Vergleich zu Angiotensin II $0,7 \pm 0,1\%$ betrug, sowie die noch geringere Bindungsfähigkeit von $0,4\%$ des Nonapeptides Des-Asp¹-Ile⁵-AI. Das für Vögel spezifische Angiotensin I $[\text{Val}^5, \text{Ser}^9]\text{AI}$ war mit $3,0 \pm 0,7\%$ bindungspotenter als das Angiotensin I anderer Spezies.

1.2.2. Angiotensin II- und III-Antagonisten

Die relative Bindungsfähigkeit von Angiotensin II und einigen seiner Antagonisten zu Rezeptoren in Glomerulosazellen ist aus Abb. 10 und 11 ersichtlich. Die K_d von Angiotensin II

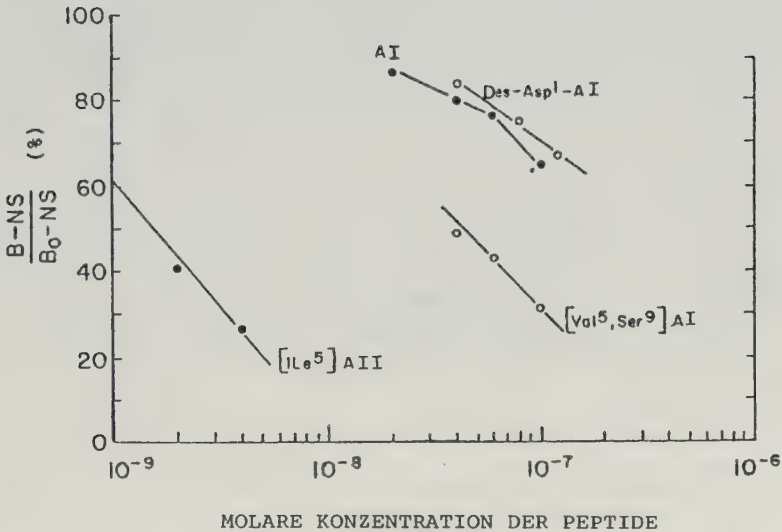


Abb. 9: Darstellung der Bindungsfähigkeit des Dekapeptides Angiotensin I (AI) (●), des AI-Analoges [Val⁵, Ser⁹]AI (○) sowie des AI-Metaboliten des Nonapeptides Des-Asp¹-AI (○) zu Rezeptoren in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde im Vergleich zu dem Oktapeptid Angiotensin II ([Ile⁵]AII) (●). Ihr Rezeptorbindungspotential wurden durch die Messung der Bindungsinhibition von ¹²⁵J-markiertem Angiotensin II durchgeführt. Jeder Punkt bedeutet den Mittelwert der dreifachen Bestimmung jedes einzelnen Experimentes (n = 5).

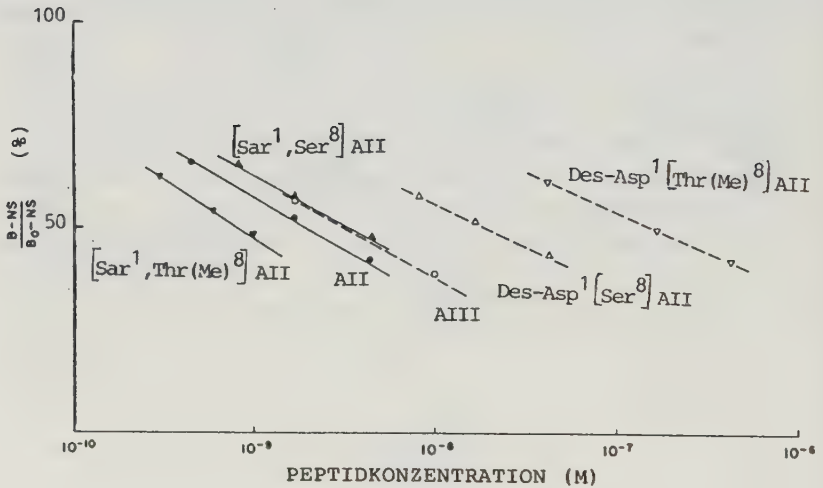


Abb. 10: Darstellung des Rezeptorbindungspotentials der Oktapeptide (—) Angiotensin II (●), $[\text{Sar}^1, \text{Thr}(\text{Me})^8] \text{AII}$ (◄) und $[\text{Sar}^1, \text{Ser}^8] \text{AII}$ (▲) sowie der Heptapeptide (---) Angiotensin III (AIII) (○), $\text{Des-Asp}^1 [\text{Ser}^8] \text{AII}$ (△) und $\text{Des-Asp}^1 [\text{Thr}(\text{Me})^8] \text{AII}$ (◄), untersucht an Glomerulosazellen der Nebennierenrinde. Die Inhibitionsfähigkeit dieser Peptide gegenüber $30 \text{ pg } ^{125}\text{J}$ -markiertem Angiotensin II beim Bindungsvorgang wurde ermittelt. Jeder Punkt im Diagramm bedeutet den Mittelwert der dreifachen Bestimmung jedes Einzelexperimentes ($n = 3$).

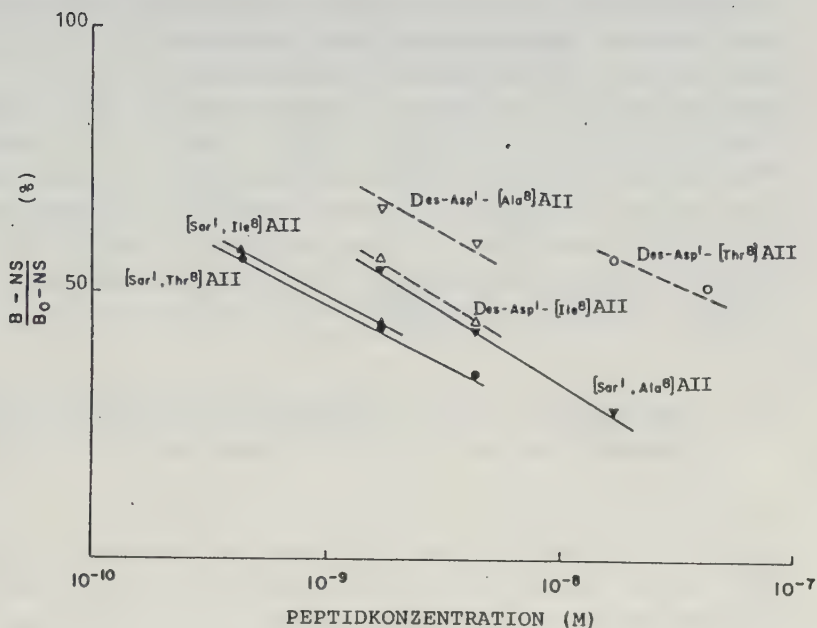


Abb.11: Vergleich der Rezeptorbindungsfähigkeit der Angiotensin II-Antagonisten (—) $[Sar^1, Thr^8] AII$ (●), $[Sar^1, Ile^8] AII$ (▲) und $[Sar^1, Ala^8] AII$ (▼) mit den korrespondierenden Angiotensin III-Antagonisten (---) $Des-Asp^1 [Ile^8] AII$ (Δ), $Des-Asp^1 [Ala^8] AII$ (∇) und $Des-Asp^1 [Thr^8] AII$ (○). Die Werte wurden aus der Messung der Inhibition der Rezeptorbindung von ^{125}J -markiertem Angiotensin II durch die verwendeten Peptide in Glomerulosazellen ermittelt. Jeder Punkt in der Darstellung repräsentiert den Mittelwert der dreifachen Bestimmung jedes Einzelexperimentes (n = 3).

war 2×10^{-9} M, während das K_d von Angiotensin III $3,3 \times 10^{-9}$ M umfaßte. Die drei stärksten Antagonisten dieser Studie besaßen K_d , die untereinander nicht signifikant differierten. Der am intensivsten wirkende Antagonist bei der Rezeptorbindung war $[\text{Sar}^1, \text{Thr}(\text{Me})^8]\text{AII}$ mit einer K_d $0,86 \times 10^{-9}$ M, gefolgt von $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{AII}$ mit K_d $0,86 \times 10^{-9}$ M und danach $[\text{Sar}^1, \text{Thr}^8]\text{AII}$ mit K_d $0,9 \times 10^{-9}$ M. Diese drei AII-Analoga sowie der AII-Antagonist $[\text{Sar}^1, \text{Ala}^8]\text{AII}$ mit K_d 1×10^{-9} M übertrafen die Rezeptorbindungsleistung von Angiotensin II. Ein anderer Antagonist, der eine signifikant niedrige Bindungsinhibitionsfähigkeit gegen ^{125}J -markiertem Angiotensin II zeigte, war $[\text{Sar}^1, \text{Ser}^8]\text{AII}$ mit der K_d von $3,5 \times 10^{-9}$ M.

1.3. Vergleich der Rezeptorbindungsfähigkeit von Okta- und Heptapeptiden in der glatten Muskulatur und der Zona glomerulosa

Tabellen III und IV fassen die Mittelwerte der K_d sowie die Dosisquotienten der Okta- und Heptapeptidantagonisten zusammen sowohl für die Rezeptoren der glatten Muskulatur als auch der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Angiotensin II zeigte eine größere Rezeptoraffinität in den Glomerulosazellen mit K_d $2,7 \times 10^{-9}$ M als in der glatten Muskulatur mit einer K_d $6,1 \times 10^{-9}$ M. Alle geprüften Angiotensin II- und III-Antagonisten waren potentere Inhibitoren des ^{125}J -markierten AII in der Zona glomerulosa als in der glatten Muskulatur. In den Zellen der Zona glomerulosa zeigte auch jeder Heptapeptid-Antagonist niedrigere Bindungsaffinität als seine korrespondierenden Oktapeptid-Antagonisten. Dasselbe wurde in der glatten Muskulatur beobachtet. Des- $\text{Asp}^1[\text{Ile}^8]\text{AII}$ besaß nur 36% der Rezeptorbindungsfähigkeit von $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{AII}$. Die anderen vier Heptapeptid-Antagonisten verfügten über noch weniger Bindungseigenschaften. Während das Angiotensin II-Analogon

TABELLE III. Vergleich der Rezeptorbindungsaffinität von Angiotensin II-Antagonisten auf Zellplasmamembranen zweier unterschiedlicher Gewebe von Ratten: glatte Uterusmuskulatur und Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. MW $\pm$ SEM; Anzahl der Untersuchungen in Klammer (n).

Verbindung	glatte Muskulatur des Uterus		Zona glomerulosa	
	K_d ($\times 10^{-9}$ M) * (n)	Dosis- Quotient **	K_d ($\times 10^{-9}$ M) (n)	Dosis- Quotient
Angiotensin II	6,1 $\pm$ 0,5 (6)	1	2,7 $\pm$ 0,3 (6)	1
Sar ¹ ,Thr(Me) ⁸ AII	2,8 $\pm$ 0,4 (5)	2,2 $\pm$ 0,2	0,87 $\pm$ 0,1 (3)	2,8 $\pm$ 0,5
Sar ¹ ,Thr ⁸ AII	3,5 $\pm$ 0,2 (3)	1,9 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,5 (3)	2,4 $\pm$ 1,2
Sar ¹ ,Ile ⁸ AII	3,9 $\pm$ 1,2 (3)	1,9 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,3 (3)	2,5 $\pm$ 0,7
Sar ¹ ,Ala ⁸ AII	9,9 $\pm$ 3 (4)	0,81 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,05 (3)	1,2 $\pm$ 0,1
Sar ¹ ,Ser ⁸ AII	24 $\pm$ 5 (4)	0,27 $\pm$ 0,09	3,1 $\pm$ 0,6 (3)	0,76 $\pm$ 0,2

* Die K_d ist die Peptiddosis, die 50% der Bindung von ¹²⁵J-Angiotensin II inhibiert.

** Die Daten wurden durch Dividieren der K_d von Angiotensin II durch K_d der Antagonisten gewonnen.

TABELLE IV. Vergleich der Rezeptorbindungsaffinität von Angiotensin III und -Antagonisten auf Zellplasmamembranen zweier unterschiedlicher Gewebe von Ratten: glatte Uterusmuskulatur und Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. MW $\pm$ SEM; Anzahl der Untersuchungen in Klammer (n).

Verbindung	glatte Muskulatur des Uterus		Zona glomerulosa	
	K_d ($\times 10^{-9}$ M) * (n)	Dosis- Quotient **	K_d ($\times 10^{-9}$ M) (n)	Dosis- Quotient
Angiotensin II	6,1 $\pm$ 0,5 (6)	1	2,7 0,3 (6)	1
Angiotensin III	32 $\pm$ 6 (5)	0,21 $\pm$ 0,03	4,2 $\pm$ 2 (4)	0,87 $\pm$ 0,3
Ile ⁷ AIII	13 $\pm$ 5,5 (4)	0,79 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,5 (3)	1,3 $\pm$ 0,1
Ala ⁷ AIII	83 $\pm$ 31 (4)	0,12 $\pm$ 0,03	25 $\pm$ 15 (3)	0,5 $\pm$ 0,3
Ser ⁷ AIII	200 $\pm$ 900 (3)	0,02 $\pm$ 0,01	19 $\pm$ 7 (3)	0,18 $\pm$ 0,08
Thr ⁷ AIII	150 $\pm$ 87 (3)	0,08 $\pm$ 0,03	29 $\pm$ 4 (3)	0,1 $\pm$ 0,004
Thr(Me) ⁷ AIII	590 $\pm$ 240 (4)	0,009 $\pm$ 0,001	140 $\pm$ 10 (3)	0,019 $\pm$ 0,003

* Die K_d ist die Peptiddosis, die 50% der Bindung von ¹²⁵J-Angiotensin II inhibiert.

** Die Daten wurden durch Dividieren der K_d von Angiotensin II durch K_d der Antagonisten gewonnen.

[Sar¹,Thr(Me)⁸]AII in den Glomerulosazellen am stärksten band, zeigte sein korrespondierendes Heptapeptid mit abgespaltenem N-terminalen Sar¹ die niedrigste Bindungspotenz.

Die Anordnung der Rezeptorbindungspotentiale der geprüften AII- und AIII-Antagonisten war in beiden Gewebsarten ähnlich. Es ergab sich die Reihenfolge:

$$\begin{aligned} &[\text{Sar}^1, \text{Thr}(\text{Me})^8] \text{AII} > [\text{Sar}^1, \text{Ile}^8] \text{AII} > [\text{Sar}^1, \text{Thr}^3] \text{AII} \geq \\ &[\text{Sar}^1, \text{Ala}^8] \text{AII} > \text{Des-Asp}^1[\text{Ile}^8] \text{AII} > [\text{Sar}^1, \text{Ser}^3] \text{AII} > \\ &\text{Des-Asp}^1[\text{Ala}^8] \text{AII}. \end{aligned}$$

Diese Übereinstimmung war nach der Regressionsanalyse ($y = 1,2x + 0,2$; $r = 0,99$; $P < 0,001$) hochsignifikant.

2. Aldosteronproduktion

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren die Stimulation der Aldosteronproduktion in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde durch ein breites Spektrum von Antagonisten. Die Wirkung von verschiedenen Angiotensin-Analogen in isolierten Glomerulosazellen, die an der initiierten Aldosteronfreisetzung erkennbar wurde, ist im Vergleich zu Angiotensin II nachfolgend in Form von Kurven, die die Relation Dosis:Antwortreaktion ausdrücken, dargestellt und als Mittelwerte in Tabellen zusammengefaßt.

2.1. Stimulation der Aldosteronfreisetzung durch Angiotensin II- und III-Analoge

Die Aldosteronproduktion in dem isolierten sensitiven System der Glomerulosazellen der Nebennierenrinde von Ratten als Antwortreaktion auf Angiotensin II, sein Val⁵-Äquivalent und

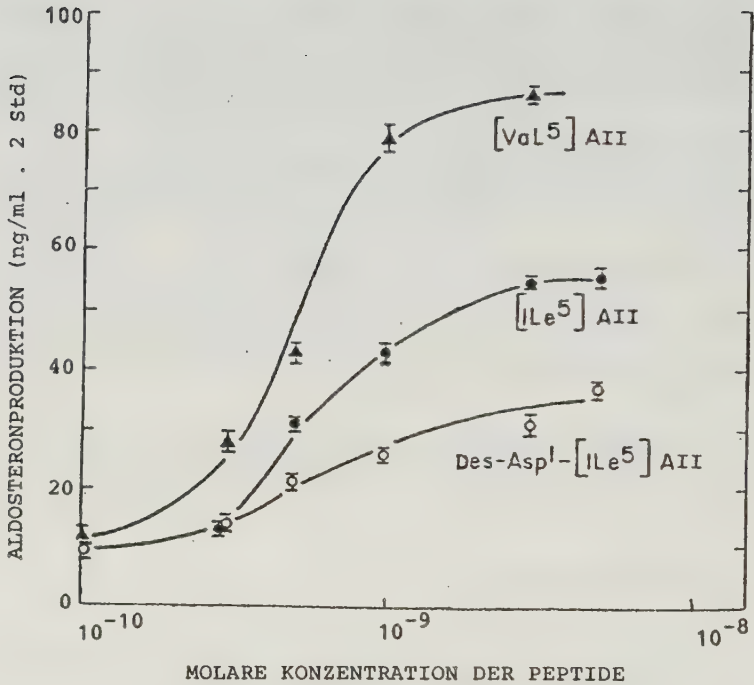


Abb. 12: Darstellung der Reaktionskurven der Aldosteronproduktion nach Applikation von menschlichem Angiotensin II ([Ile⁵] AII) (●) sowie seinem Analogon [Val⁵] AII (Δ) und seinem Metaboliten Des-Asp¹-Ile⁵-AII (Angiotensin III) (o) in isolierten Glomerulosazellen der Nebennierenrinde bei Ratten. Die Inkubation der Zellen mit Angiotensinen dauerte 2 Std bei 37°C. Die Punkte bedeuten Mittelwerte ± SEM aus sechs Experimenten.

sein Des-Asp¹-Metaboliten (Angiotensin III) sind aus Abbildung 12 ersichtlich. Daraus ergibt sich, daß das [Val⁵]AII-Analogon die Aldosteronfreisetzung um $147 \pm 17\%$ gegenüber Angiotensin II stimuliert. Dagegen rief Angiotensin III eine niedrigere Aldosteronsekretion von $55 \pm 12\%$ hervor. Die durch Angiotensine stimulierte Aldosteronproduktion ist nachweislich abhängig von der Dosis dieser Peptide.

Abbildung 13 ergänzt zu Abb. 12 die Wirkung von Des-Asp¹-Val⁵-AII, die mit $74 \pm 13\%$ ebenfalls niedriger ausfällt als Val⁵-AII, aber höher als Des-Asp¹-Ile⁵-AII. Aus dieser Abbildung ist eine Parallelität der Effekte von AII zu seinem Val⁵-Äquivalenten einerseits und zu ihren Heptapeptidmetaboliten Des-Asp¹-Ile⁵-AII bzw. Des-Asp¹-Val⁵-AII andererseits erkennbar.

Weitere Reaktionskurven befinden sich in Abb. 14. Das mit dem Sarcosin (MeGly¹) in der 1. Position substituierte Angiotensin II-Analogon Sar¹-Ile⁵-AII verursachte eine relativ starke Aldosteronproduktion von $170 \pm 7,9\%$. Im Kontrast dazu zeigte Me₂Gly¹-Ile⁵-AII deutlich niedrigere Aldosteronwerte mit $72 \pm 10,8\%$ als das vergleichbare Analogon mit einer Methylgruppe weniger in der ersten Position, dem Sar¹-Ile⁵-AII.

2.2. Stimulation der Aldosteronproduktion durch Angiotensin I und seine Verwandten

Die Reaktionskurven der Aldosteronsekretion in isolierten Glomerulosazellen durch das Dekapeptid Ile⁵-His⁹-AI (Angiotensin I) und sein Analogon Val⁵-Ser⁹-AI werden in Abb. 13 mit der Wirkung von Angiotensin II (Ile⁵-AII) und seinem Analogon Val⁵-AII verglichen. Das Vogel-Angiotensin I (Val⁵-Ser⁹-AI) mit dem durchschnittlichen Stimula-

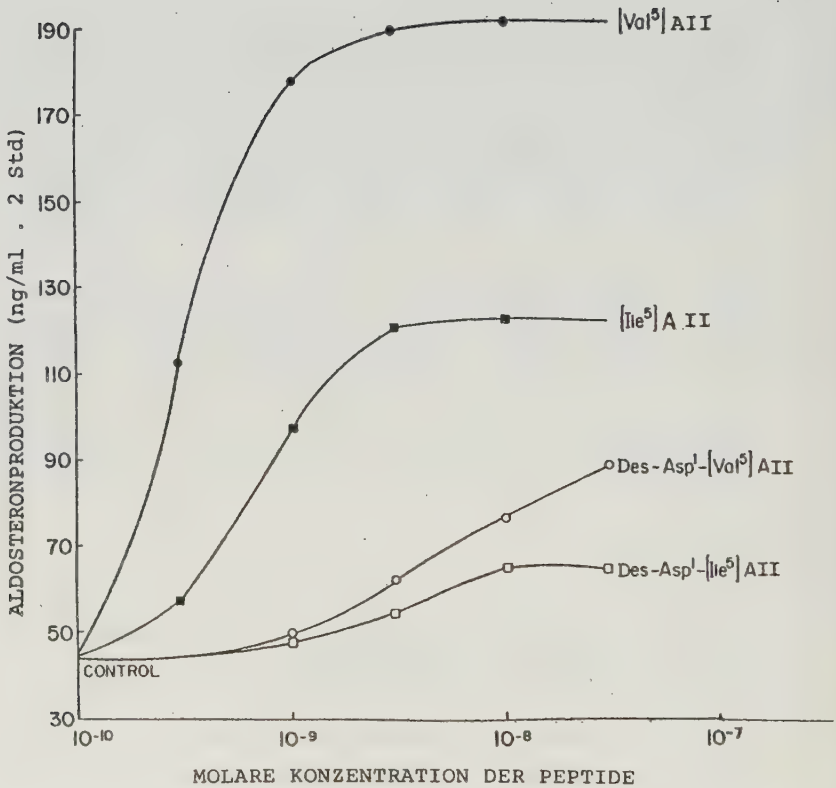


Abb. 13: Reaktionskurven der Aldosteronproduktion auf äquimolare Konzentrationen der Oktapeptide $[Val^5]AII$ (●) und $[Ile^5]AII$ (■) sowie deren korrespondierende Heptapeptide $Des-Asp^1[Val^5]AII$ (○) und $Des-Asp^1[Ile^5]AII$ (□) bei isolierten Glomerulosazellen. Die Inkubationszeit dauerte 2 Std bei $37^\circ C$. Die Punkte bezeichnen Mittelwerte von sechs Experimenten bei dreifacher Bestimmungen.

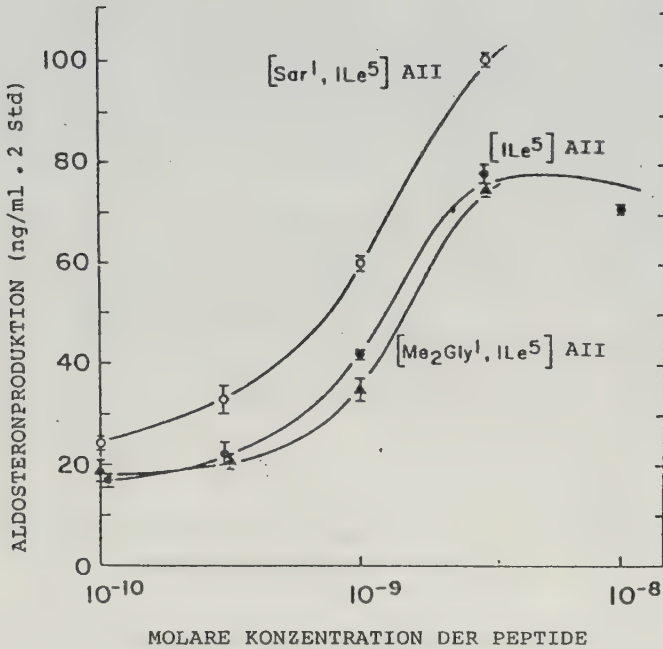


Abb. 14: Reaktionskurven der Aldosteronfreisetzung auf äquimolare Konzentrationen von Angiotensin II ($[Ile^5]AII$) (●) und seinen Analogen mit substituierter Asp¹ durch Glycin in der 1. Position, worin eine unterschiedliche Anzahl von Methylgruppen gebunden ist, $[Me_2Gly^1]AII$ (▲) und $[MeGly^1]$ (Sarcosin) (○). Die Inkubation der isolierten Glomerulosazellen dauerte 2 Std bei 37°C. Die Mittelwerte $\pm$ SEM wurden von sechs Experimenten nach dreimaliger Bestimmung ermittelt.

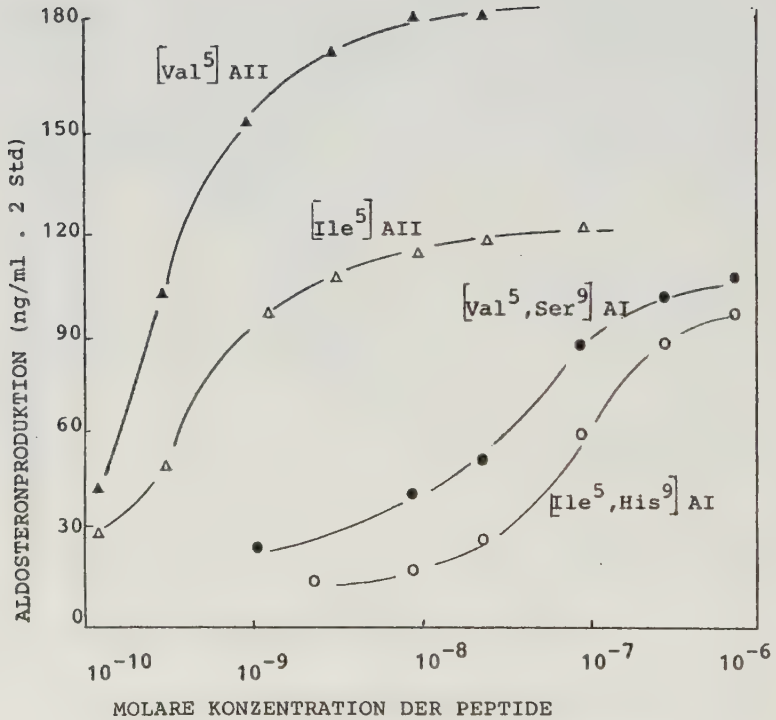


Abb. 15: Reaktionskurven der Aldosteronproduktion auf die Wirkung des Deakaepetides Angiotensin I ($[Ile^5, His^9] AI$) (○) und seines Analoges $[Val^5, Ser^9] AI$ (●) im Vergleich zu dem Oktapeptid Angiotensin II ($[Ile^5] AII$) (Δ) und dessen Analogon $[Val^5] AII$ (▲). Die Inkubation der Glomerulosa-zellen der Nebennierenrinde dauerte 2 Std bei 37°C. Die Mittelwerte $\pm$ SEM wurden aus einer dreifachen Bestimmung der vier Experimenten erhalten.

tionseffekt von $10 \pm 4,5\%$ auf die Aldosteronfreisetzung wirkte stärker im Vergleich zu menschlichem Angiotensin I ($\text{Ile}^5\text{-His}^9\text{-AI}$) mit $5,1 \pm 1,1\%$. Beide Dekapeptide unterscheiden sich deutlich von den Oktapeptiden durch ihre geringe Stimulation der Aldosteronproduktion.

Abbildung 16 ergänzt die vorausgehende Abb. 15 mit der Darstellung der Aktivität des Nonapeptides $\text{Des-Asp}^1\text{-Ile}^5\text{-AI}$ auf die Aldosteronfreisetzung in Glomerulosazellen. Dieser AI-Metabolit mit dem stimulierenden Effekt von $2,9 \pm 1,2\%$ erwies sich weniger aktiv als das Angiotensin I und minimal aktiv im Vergleich zu Angiotensin II und seinem Metaboliten $\text{Des-Asp}^1\text{-Ile}^5\text{-AII}$.

2.3. Agonistische Eigenschaften der Angiotensin-Antagonisten

Die Angiotensin-Antagonisten äußerten aber auch agonistische Stimuli auf die Aldosteronfreisetzung, die innerhalb der vorliegenden Untersuchungen ermittelt wurden. In Abb. 17 werden die Reaktionskurven von Angiotensin II und der untersuchten Oktapeptidantagonisten demonstriert. Alle Daten wurden durch die Blankprobenwerte des basalen Aldosterons korrigiert. $\text{Sar}^1\text{-Ile}^5\text{-AII}$ rief das relativ größte Aufkommen an Aldosteron bei der Dosierung von 10^{-9} M hervor und differierte nur wenig von AII bei dieser Konzentration. Hingegen stimulierten $\text{Sar}^1\text{-Ser}^8\text{-AII}$ und $\text{Sar}^1\text{-Thr}^8\text{-AII}$ die Aldosteronsekretion nur unbedeutend bei allen getesteten Dosierungen.

In Abbildung 18 befinden sich die Kurven der agonistischen Aktivität von Heptapeptidantagonisten bei der Aldosteronproduktion. $\text{Des-Asp}^1\text{-Ile}^8\text{-AII}$ und $\text{Des-Asp}^1\text{-Ala}^8\text{-AII}$ stimulierten bei einer Dosis von 10^{-9} M die Aldosteronsekretion beinahe ebenso stark wie $\text{Des-Asp}^1\text{-AII}$ (Angiotensin III). Dieser

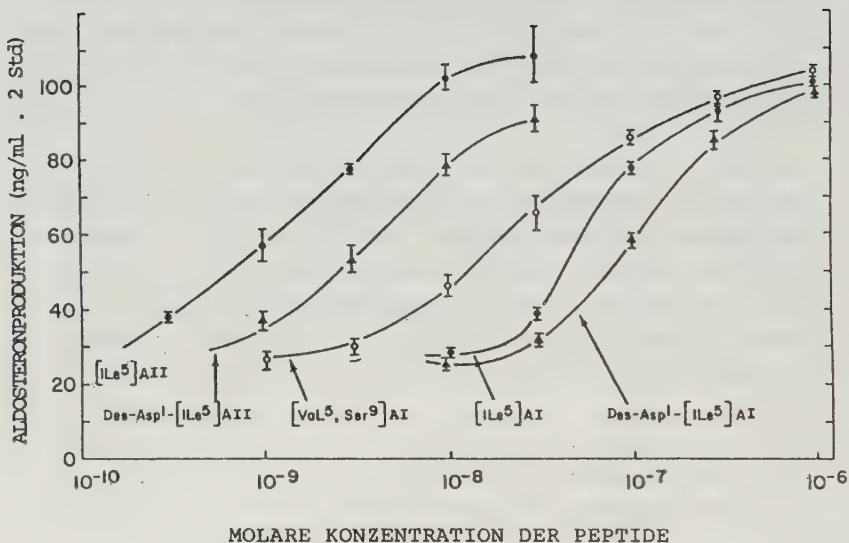


Abb. 16: Reaktionskurven der Aldosteronproduktion auf die Wirkung der Dekapeptide $[Val^5, Ser^9]AI$ (○), $[Ile^5]AI$ (Angiotensin I) (●) und seines Metaboliten, des Nonapeptids $Des-Asp^1[Ile^5]AI$ (▲), im Vergleich zu Angiotensin II ($[Ile^5]AII$) (○) und seinem Metaboliten, dem Heptapeptid $Des-Asp^1[Ile^5]AII$ (Angiotensin III) (▲). Die Inkubationszeit von Glomerulosazellen der Nebennierenrinde mit den Peptiden dauerte 2 Std bei 37°C. Die Punkte bezeichnen Mittelwerte $\pm$ SEM bei dreifacher Bestimmungen von 3 Experimenten.

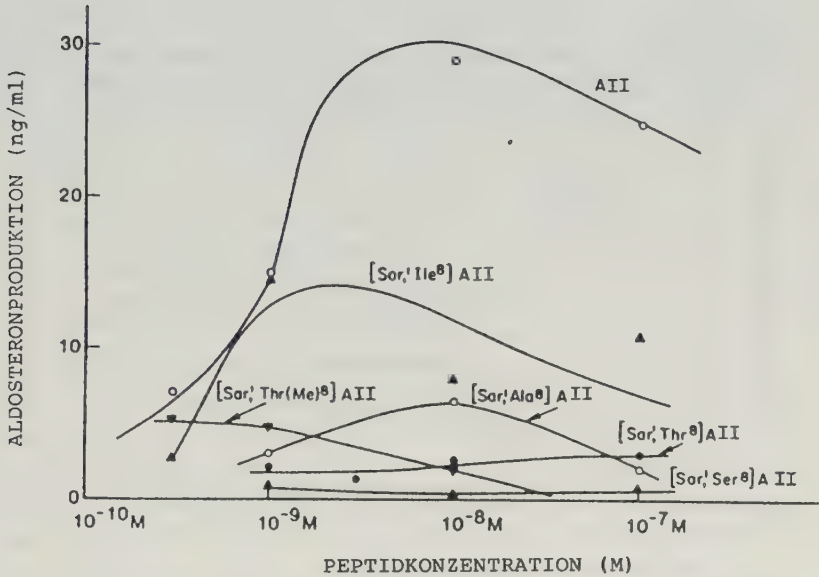


Abb. 17: Reaktionskurven der Aldosteronfreisetzung auf die Wirkungen von Angiotensin II (AII) (o) und Okta-peptid-Antagonisten [Sar¹, Ile⁸] AII (▲), [Sar¹, Thr(Me)⁸] AII (▼), [Sar¹, Ala⁸] AII (o), [Sar¹, Thr⁸] AII (●) und [Sar¹, Ser⁸] AII (▲) in isolierten Glomerulosazellen der Nebennierenrinde. Die Inkubationszeit dauerte 2 Std bei 37°C. Die Werte bedeuten MW von sechs Versuchen.

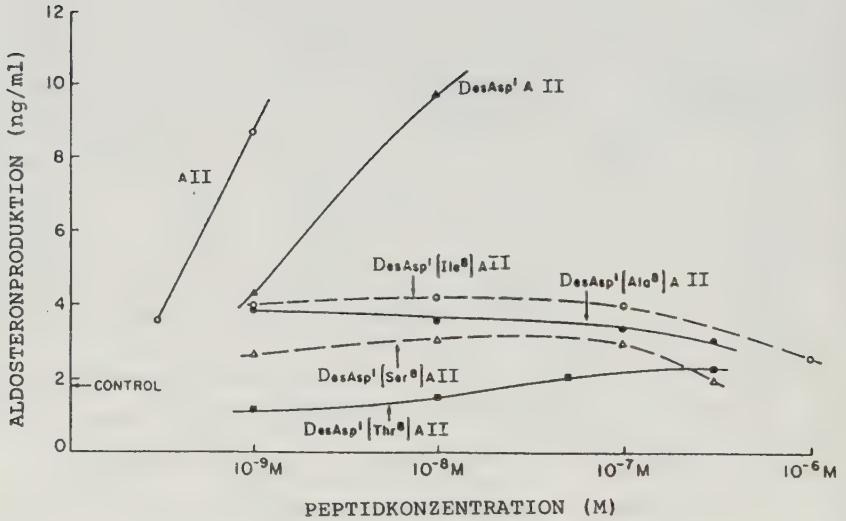
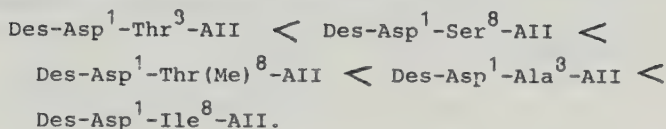


Abb. 18: Reaktionskurven der Aldosteronproduktion auf die Wirkung von äquimolaren Konzentrationen der Heptapeptid-Antagonisten Des-Asp¹[Ile⁸]AII (o--o), Des-Asp¹[Ala⁸]AII (●--●), Des-Asp¹[Ser⁸]AII (Δ--Δ) und Des-Asp¹[Thr⁸]AII (■--■) im Vergleich zu Angiotensin II (AII) (o) und Angiotensin III (▼). Jeder Punkt repräsentiert MW aus einer dreifachen Bestimmung bei sechs Experimenten.

Befund wiederholt sich nicht bei einer Dosis von 10^{-8} M und höher.

Die Anordnung der getesteten Heptapeptid-Antagonisten nach ihrer agonistischen Wirkung bei der Stimulierung der Aldosteronfreisetzung zeigt folgende Reihe:



2.4. Inhibition der Aldosteronsekretion durch Angiotensin II- und III-Antagonisten

Die durch Angiotensin II angeregte Aldosteronproduktion in der Zona glomerulosa kann durch Angiotensin-Antagonisten gehemmt werden. Der Inhibitionseffekt bei der Standarddosis von 10^{-9} M der Okta- und Heptapeptid-Antagonisten auf die Aldosteronfreisetzung, die von dem physiologisch stark wirkenden Angiotensin II induziert wird, ist in Abb. 19 dargestellt. Die Ergebnisse wurden an 5 Experimenten überprüft. Auf der Ordinate ist der Prozentsatz der maximalen Aldosteronproduktion abzulesen, auf die Abszisse das Verhältnis der Konzentration des Antagonisten zur Konzentration von Angiotensin II.

Jeder Oktapeptid-Antagonist erwies sich als effektiver als sein korrespondierender Heptapeptid-Antagonist, wie durch die 50% niedrigere Inhibitionsdosis (ID_{50}) nachgewiesen werden konnte. So war zum Beispiel die ID_{50} von $\text{Des-Asp}^1\text{-Ile}^8\text{-AII}$ 8,6 mal höher als dieselbe von $\text{Sar}^1\text{-Ile}^8\text{-AII}$; oder ID_{50} von $\text{Des-Asp}^1\text{-Thr}^3\text{-AII}$ war 67 mal höher als dieselbe von $\text{Sar}^1\text{-Thr}^3\text{-AII}$.

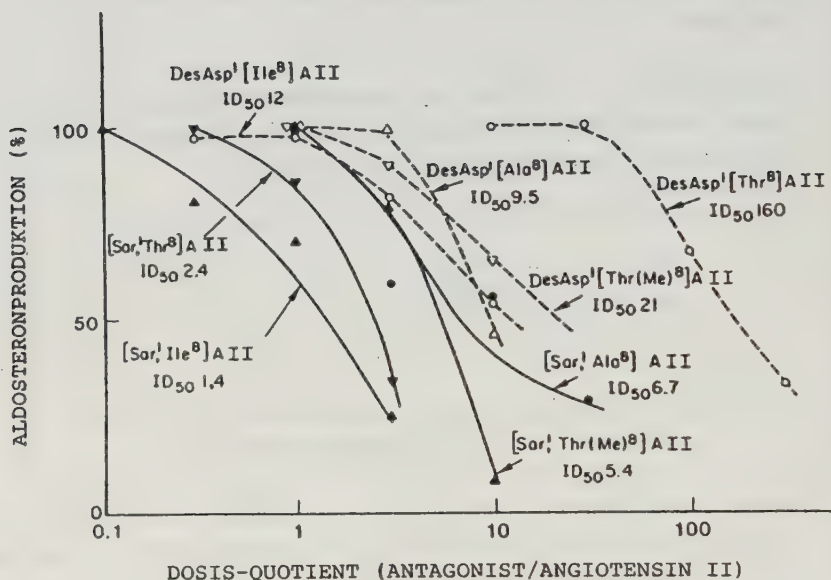


Abb. 19: Darstellung des Inhibitionseffektes der Oktapeptid-Antagonisten (—) [Sar¹, Ile⁸] AII (▲), [Sar¹, Thr⁸] AII (▼), [Sar¹, Thr(Me)⁸] AII (◄) und [Sar¹, Ala⁸] AII (●) und Heptapeptid-Antagonisten (---) Des-Asp¹[Ile⁸] AII (○), Des-Asp¹[Thr(Me)⁸] AII (◄), Des-Asp¹[Ala⁸] AII (△) und Des-Asp¹[Thr⁸] AII (○) in verschiedenen Konzentrationen auf die Aldosteronproduktion, geteilt durch die Standarddosis von 10⁻⁹ M von Angiotensin II. Jeder Punkt bedeutet Mittelwert einer dreifachen Bestimmung. ID₅₀-Werte sind bei 50% der inhibierenden Dosen der Angiotensin-Antagonisten.

Ein Diagramm der Aldosteronproduktion nach Lineweaver-Burk aus abgestuften Dosen von Angiotensin II sowie der festgelegten Dosis von 4×10^{-10} M einiger Oktapeptid-Antagonisten wurde verwendet, um den Mechanismus des inhibierenden Effektes dieser Antagonisten zu determinieren (Abb. 20). Der Ordinatenschnittpunkt ($1/A_{\max}$) oder das Maximum der biologischen Antwortreaktion war dasselbe für die Mehrzahl der Antagonisten (0,026); Sar¹-Ala⁶-AII bildete eine Ausnahme (0,02), war dennoch ganz dicht bei den anderen Antagonisten angeordnet. In zwei zusätzliche Experimenten jedoch erreichte Sar¹-Ala⁸-AII denselben Ordinatenschnittpunkt wie die übrigen Antagonisten.

3. Vergleich der Rezeptorbindung mit der Aldosteronproduktion durch Angiotensin I-, II- und III-Analoga in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde

Die Werte (in %) der Rezeptorbindung der Dekapeptide und eines Nonapeptides sowie die Werte der Aldosteronproduktion in Glomerulosazellen der Nebennierenrinde von Ratten sind in Tabelle V enthalten. Alle drei Angiotensin I-Verbindungen zeigten zwar eine relativ geringe Bindungsaffinität und Aldosteronstimulation, jedoch waren diese Eigenschaften in jedem Falle nachweisbar und verliefen signifikant parallel. Die Gleichung aus der Regressionsanalyse zwischen diesen zwei Variablen lautet $y = 0,13x + 0,22$; ($r = 0,99$; $P < 0,01$).

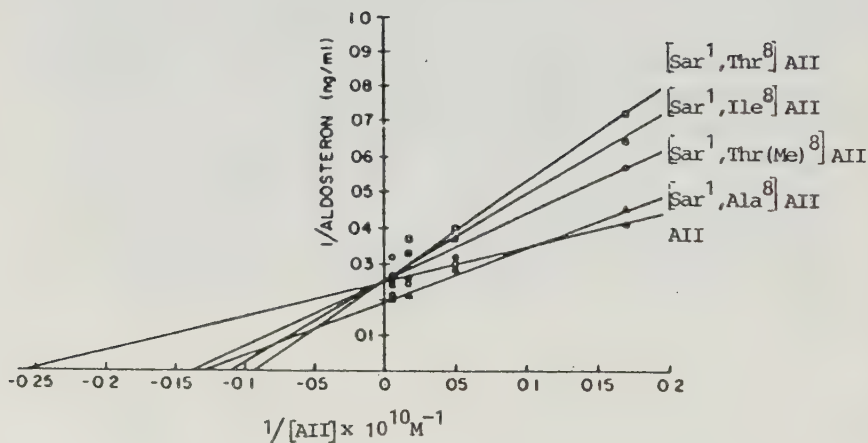


Abb. 20: Diagramm nach Lineweaver-Burk mit den Daten der Antwortreaktion der Aldosteronproduktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Angiotensin II sowie der festgelegten Dosis ($1,7 \times 10^{-9}$ M) von vier Angiotensin II-Antagonisten [Sar¹, Thr⁸] AII (□), [Sar¹, Ile⁸] AII (■), [Sar¹, Thr(Me)⁸] AII (○) und [Sar¹, Ala⁸] AII (△). Der Schnittpunkt auf der Ordinate repräsentiert den maximalen Wert der AII-Bindung. Jeder Punkt bedeutet MW einer dreifachen Bestimmung jedes Einzelexperimentes.

TABELLE V. Vergleich der relativen Werte der Rezeptorbindungsfähigkeit und der Aldosteronfreisetzung durch Dekapeptide und ein Nonapeptid in Glomerulosazellen der Nebennierenrinde von Ratten im Verhältnis zu Angiotensin II.

Verbindung	Rezeptor- bindung *	Aldosteron- Produktion *
	%	%
Angiotensin II (Ile ⁵ -AII)	100 **	100 ***
Angiotensin I (Ile ⁵ -His ⁹ -AI)	0,68	5,1
Vogel-Angiotensin I (Val ⁵ -Ser ⁹ -AI)	3,0	23,8
Nonapeptid (Des-Asp ¹ -Ile ⁵ -His ⁹ -AI)	0,4	2,9

* Die Werte sind aus dem Vergleich von 50% Inhibitions-
potential der Bindung von ¹²⁵J-Angiotensin II und von
50% der Aldosteronproduktion errechnet (ED₅₀).

** K_d = 2,9 x 10⁻⁹ M (n = 6).

*** ED₅₀ = 1,7 ± 0,4 x 10⁻⁹ M.

Tabelle VI listet die Mittelwerte von Dosisquotienten der Oktapeptid-Antagonisten als Inhibitoren der Rezeptorbindung und der Aldosteronproduktion von Angiotensin II aus drei Experimenten auf, die durch die Scatchard-Analyse ermittelt wurden. Außerdem stellt die Tab. VI das relative Potential der Rezeptorbindungshemmung der Oktapeptid-Antagonisten dem Quotienten des Lineweaver-Burk Diagrammes gegenüber. Die Gleichung, die die Beziehung zwischen den zwei Reihen der Variablen definiert, heißt $y = 0,41x + 0,83$ ($r = 0,78$; $P < 0,005$). Sie zeigt eine gültige Übereinstimmung zwischen der Inhibition der Rezeptorbindung und der Inhibition der Aldosteronproduktion.

Eine Übersicht über die Rezeptorbindungspotenz der Angiotensinverbindungen wie auch über ihre agonistische bzw. antagonistische Wirkung auf die Aldosteronproduktion verschaffen die Tabellen VII und VIII.

Tabelle VII enthält die Ergebnisse der Oktapeptidanaloge. Ihre Anordnung basiert auf ihrer Wirksamkeit in der Rezeptorbindung, die größte oben, die niedrigste unten. Ihre relative Aktivität findet ihren Ausdruck in den Dosisquotienten. Es läßt sich folgende Charakteristik ableiten:

- a) Allgemein betrachtet besaßen Sar^1 -Derivate eine wesentlich höhere Bindungsaffinität zu Rezeptoren als andere Angiotensin-Analoge.
- b) Die Substitution einer aliphatischen Aminosäure in die 8. Position der Peptidkette ist mit kompetitiv antagonistischer Wirkung auf die Aldosteronproduktion verbunden.
- c) Die Ergebnisse der Rezeptorbindungsfähigkeit der Angiotensin II-Analoge und der darauffolgenden Antwortreaktion der Aldosteronfreisetzung korrelieren sowohl bei Agonisten ($r = 0,73$; $P < 0,05$) als auch bei Antagonisten ($r = 0,78$; $P < 0,05$) positiv.
- d) Obwohl die drei Antagonisten $\text{Sar}^1\text{-Thr(Me)}^8\text{-AII}$, $\text{Sar}^1\text{-$

TABELLE VI. Vergleich des Potentials der Oktapeptid-Antagonisten als Inhibitoren der Aldosteronproduktion und der Rezeptorbindung.

Verbindung	Quotient der Inhibition der Aldosteronproduktion *	Dosisquotient der Inhibition der Rezeptorbindung **
Sar ¹ -Ile ⁸ -AII	2,3 ± 0,2	2,5
Sar ¹ -Thr ⁸ -AII	1,8 ± 0,6	2,4
Sar ¹ -Thr(Me) ⁸ -AII	1,6 ± 0,3	2,8
Sar ¹ -Ala ⁸ -AII	1,3 ± 0,1	1,2
Sar ¹ -Ser ⁸ -AII	1,1 ± 0,1	0,76

* Die Daten (MW ± SEM) wurden durch das Lineweaver-Burk-Diagramm gewonnen (Division des Neigungswinkels der Geraden des Antagonisten durch den Neigungswinkel der Geraden von Angiotensin II).

** Die Daten wurden durch Dividieren der Angiotensin II-Konzentration durch die Konzentrationen des Antagonisten, in der halben Höhe (50%) seiner Inhibitionsfähigkeit gegenüber ¹²⁵J-Angiotensin-Rezeptorbindung in der Zellplasmamembranen der Zona glomerulosa, gewonnen.

TABELLE VII. Die relative Rezeptorbindungs-fähigkeit sowie die Stimulation der Aldosteronproduktion der agonistisch und antagonistisch wirkenden Angiotensin II-Analoge auf Glomerulosazellen der Nebennierenrinde von Ratten.

Verbindung	Dosisquotient- Rezeptor- bindungs- Affinität *	Quotienten der Aldosteronproduktion	
		agonistische Aktivität	antagonistische Aktivität
Angiotensin II	1	1	
A. Agonisten:			
Sar ¹ -AII	2,07	1,7	
Val ⁵ -AII	0,69	1,47	
Me ₂ Gly ¹ -AII	0,63	0,84	
B. Antagonisten			
Sar ¹ -Thr(Me) ⁸ -AII	2,8	0,45	1,6
Sar ¹ -Ile ⁸ -AII	2,5	0,55	2,3
Sar ¹ -Thr ⁸ -AII	2,4	0,35	1,8
Sar ¹ -Ala ⁸ -AII	1,2	0,44	1,3
Sar ¹ -Ser ⁸ -AII	0,76	0,27	1,1

* Die Werte wurden durch Dividieren der K_d von Angiotensin II durch die K_d des Analoges berechnet.

Ile⁸-AII und Sar¹-Thr⁸-AII ein fast gleich hohes Rezeptorbindungsvermögen aufweisen, variiert ihre antagonistische Wirkung auf die Aldosteronsekretion. Der stärkste Antagonist ist demzufolge Sar¹-Ile⁸-AII, gefolgt von Sar¹-Thr⁸-AII.

Die Rezeptorbindungspotentiale der Heptapeptid-Analoga sowie die Antwortreaktion der Aldosteronfreisetzung in den Glomerulosazellen sind in Tabelle VIII zusammengestellt. Die Reihenfolge berücksichtigt die Intensität der Rezeptorbindung vom stärksten bis zum schwächsten Heptapeptid der Untersuchung. Daraus lassen sich folgende Merkmale erkennen:

- a) Die Aktivität aller geprüften Heptapeptide in Hinsicht auf ihre Eigenschaften bei der Rezeptorbindung und Aldosteronstimulation war weniger ausgeprägt als die der Oktapeptide.
- b) Die antagonistische Wirkung gegenüber der Aldosteronproduktion war bei Des-Asp¹-Ile⁸-AII am deutlichsten, gefolgt von Des-Asp¹-Ala⁸-AII sowie Des-Asp¹-Thr⁸-AII.
- c) Die Beziehung zwischen der Rezeptorbindungsfähigkeit und der antagonistischen Wirkung auf die Aldosteronsekretion zeigten eine signifikante Korrelation ($r = 0,82$; $P < 0,05$).

TABELLE VIII. Vergleich der Rezeptorbindungsfähigkeit zu ^{125}J -Angiotensin II und der Aldosteronfreisetzung durch äquimolare Konzentrationen von Heptapeptid-Analoge in Glomerulosazellen der Nebennierenrinde von Ratten.

Verbindung	Dosisquotient- Rezeptor- bindungs- Affinität *	Quotienten der Aldosteronproduktion	
		agonistische Aktivität	antagonistische Aktivität
Angiotensin II	1	1	
Des-Asp ¹ -Ile ⁵ -AII (AIII)	0,72	0,59	
Des-Asp ¹ -Val ⁵ -AII	0,92	0,34	
<u>Antagonisten:</u>			
Des-Asp ¹ -Ile ⁸ -AII	1,3	0,55	0,83
Des-Asp ¹ -Ala ⁸ -AII	0,5	0,52	0,6
Des-Asp ¹ -Ser ⁸ -AII	0,18	0,3	0,15
Des-Asp ¹ -Thr ⁸ -AII	0,1	0,2	0,5
Des-Asp ¹ -Thr(Me) ⁸ -AII	0,019	0,3	0,05

* Die Werte wurden durch Dividieren der K_d des Angiotensin II durch die K_d des Angiotensin-Analoges berechnet.

F. DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Rezeptorbindungsaffinität der Angiotensinderivate an die glatten Muskulatur unterschiedlich von der an die Glomerulosazellen der Nebennierenrinde ist. Substitutionen an zwei Stellen der Aminosäuresequenz des Angiotensins spielen dabei eine zentrale Rolle: Erstens, der Austausch der Asparaginsäure in der ersten Position der Angiotensinkette durch das N-terminale methylierte Glycin (Sarcosin) brachte ein Angiotensin-Analogon mit größerer Rezeptorbindungsfähigkeit als das natürliche Angiotensin II hervor. Sar¹-AII-Derivate sind für ihre verlangsamte Hydrolyse bekannt, während der Abbau von Asparaginsäure¹-AII durch Angiotensinase A schneller verläuft (74). Die Resistenz von Sar¹-AII-Derivaten zu Angiotensin-degradierenden Enzymen bedingt ein längeres Verbleiben in dem Effektor-Rezeptorkomplex und die Ausübung von spezifischen Effekten auf die Zielorgane. Aus der Methylierung des Glycins in der 1. Position resultiert die Bildung eines sehr stabilen N-Sar¹-AII-Analogons. Infolgedessen erhöht sich die Bindungsaktivität für Rezeptorstellen. Die Einsetzung von zwei Methylgruppen, wie unsere Ergebnisse zeigen, erbrachte ein schwachbindendes AII-Derivat. Zweitens, durch die Substitution des C-terminalen Phenylalanins mit einer aliphatischen Aminosäure entstand ein AII-Analogon mit starken kompetitiven Eigenschaften gegen die natürlichen Angiotensine für die Besetzung der Rezeptorstellen und mit hemmender Wirkung für die von AII verursachte Stimulation der Aldosteronfreisetzung und der Kontraktion der glatten Muskulatur. Auf diese Weise scheinen solche AII-Analoga zur Blockierung der Angiotensin-spezifischen Rezeptorstellen geeignet zu sein (19).

Die vorliegenden Untersuchungen über die Rezeptorbindungseigenschaften der Angiotensin-Analoga in der glatten Muskulatur

REZEPTORBINDUNGS-AFFINITÄT der Angiotensinderivate (in %)

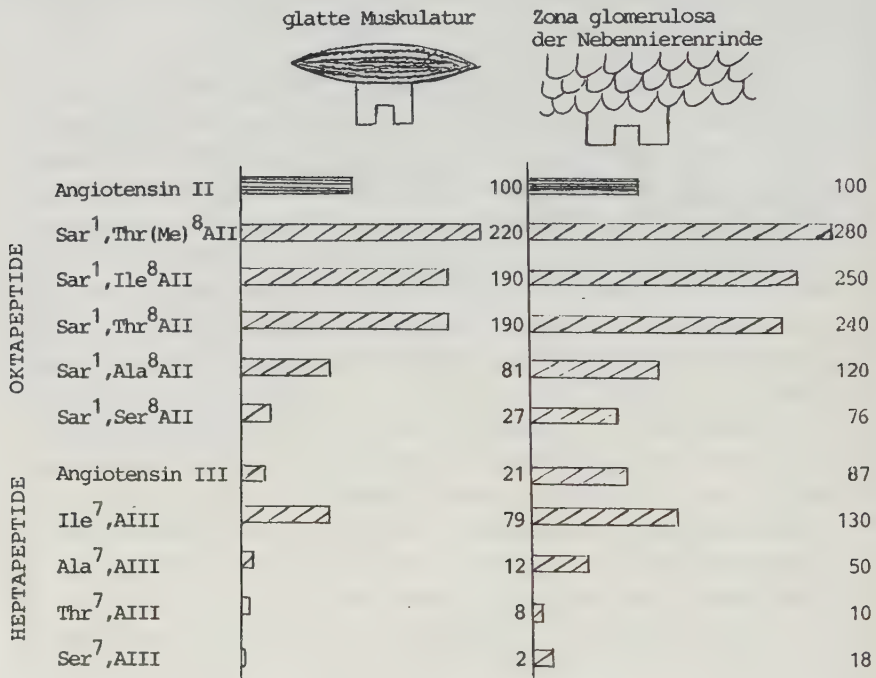


Abb. 21: Graphische Darstellung der Rezeptorbindungsaffinität von Angiotensinderivaten in der glatten Muskulatur und in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde im Vergleich zu der von natürlichem Angiotensin II. Das Verhalten der Oktapeptide weist bei beiden Gewebsarten dieselbe Anordnung auf, jedoch erreicht die Rezeptorbindung in der Zona glomerulosa eine höhere Stufe. Die Heptapeptide verfügen über eine weniger ausgeprägte Rezeptorbindung als die Oktapeptide. Diese Peptide zeigen in beiden Organen eine ähnliche Reihenfolge; der Ausprägungsgrad der Rezeptorbindung ist in den Glomerulosazellen höher.

und den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde demonstrieren zwar unterschiedliche Affinität; die Rangordnung der verschiedenen Analoga bezüglich ihrer Affinität ist in beiden Gewebsarten gleich (siehe Abb. 21). Obwohl die beiden Zielorgane ein unterschiedliches Bindungspotential zu Angiotensin besitzen, und zwar stärker in der Zona glomerulosa, wurde Übereinstimmung in der Anordnung der Angiotensin-Analoga nach der Bindungsaffinität gefunden. Weiterhin ergab sich, daß jedes Oktapeptid höhere Bindungsfähigkeit zu beiden sensitiven Systemen zeigte als das korrespondierende Heptapeptid. Die genannten Befunde offenbaren Ähnlichkeiten im Verhalten der Rezeptoren zweier verschiedener Gewebe zu bestimmten physiologisch aktiven Stoffen. Die unterschiedliche Bindungspotenz dieser Gewebe beruht wahrscheinlich auf einer unterschiedlichen Anzahl von offenen Rezeptorstellen.

Diese Studien unterstützen die Annahme, daß die Aldosteronproduktion aus der Nebennierenrinde durch Angiotensin-Analoga regulierbar ist. Aus der Abb. 22 ist zu entnehmen, daß es bei dem Einsatz von Sarcosin in der 1. Position oder Valin in der 5. Position der Angiotensinkette zu einer deutlichen Erhöhung des agonistischen Effektes der Oktapeptide kam. Heptapeptid-Agonisten zeigten weniger Aktivität im Vergleich zu Angiotensin II, die auf ihre kürzere Halbwertszeit bzw. ihren schnelleren Abbau zurückzuführen ist (26). Thr(Me)⁷-AIII zeigte im Gegensatz zu seinem korrespondierenden Oktapeptid auch agonistische Eigenschaften bei der Aldosteronfreisetzung aus der Zona glomerulosa, welche vom Vorhandensein einer polaren Methylgruppe in C-7-terminaler Position abhängig war. Das Ausmaß der agonistischen Wirkung der Oktapeptide und Heptapeptide korreliert wesentlich mit ihrer Rezeptorbindungsaffinität. Die Angiotensin-Agonisten sind bei experimentellen Studien zur Erzeugung von Hypertonie und Hyperaldosteronismus verwendbar. Die Anwendung von Angiotensin-Agonisten als

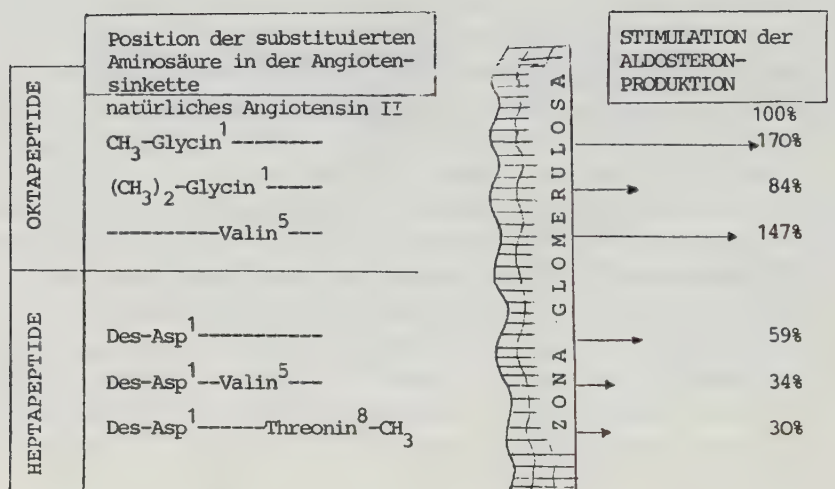


Abb. 22: Strukturelle Modifikationen in der Angiotensinkette bei Okta- und Heptapeptiden, die eine dem Angiotensin II ähnliche Wirkung besitzen, d.h. eine Stimulation der Aldosteronfreisetzung aus der Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde verursachen. Der agonistische Effekt dieser Angiotensin-Analoga ist ausgeprägt bei den Oktapeptidagonisten, insbesondere den Sarcosin¹(CH₃-Glycin)-Derivaten, und moderat bei den Heptapeptidagonisten.

ein Infusionstest bei Dialysepatienten mit Hypotonie zur Prüfung der Kontraktilität des linken Ventrikels bzw. zur Feststellung einer Herzmuskelinsuffizienz (63), (107) sowie bei experimentellen Schockzuständen (87) befindet sich noch in der experimentellen Phase.

Die Untersuchungen zeigten, daß antagonistische Wirkungen der Angiotensin II-Antagonisten auf die Aldosteronproduktion in der Zona glomerulosa von einer Serie von Oktapeptiden mit der Substitution von Sarcosin in der 1. Position und einer aliphatischen Aminosäure in der 8. Position, wie Isoleucin, Threonin, Alanin oder Serin ausgehen. Der Mechanismus der Blockierung der Aldosteron-sezernierenden Funktion der Glomerulosazellen umfaßt die kompetitive Besetzung der spezifischen Angiotensin-rezeptoren, wodurch eine Stimulation der Aldosteronproduktion verhindert wird. Wie Abb. 23 zu entnehmen ist, wurden drei AII-Antagonisten vor dem bewährten Saralasin eingeordnet. Der stärkste AII-Antagonist der Aldosteronstimulation war nach unseren Studien $\text{Sar}^1\text{Ile}^8\text{AII}$. Seine Wirkung auf die Rezeptorbindung und Steroidgenese kann vom substituierten Isoleucin herrühren. Danach folgten beide Threonin⁸-AII-Derivate, und zwar $\text{Sar}^1\text{Thr}^8\text{AII}$ und $\text{Sar}^1\text{Thr}(\text{Me})^8\text{AII}$. Die AII-Antagonisten zeigten wesentliche Vorteile durch ihre höhere Rezeptorbindungsaktivität und den weniger ausgeprägten agonistischen Begleiteffekt auf die Aldosteronproduktion als andere geprüfte Angiotensin-Antagonisten (vgl. Tab. VII). Die vorliegenden Ergebnisse über die AII-Antagonisten unterstützen die Auffassung, daß diese Mittel zur Regulierung der Aldosteronproduktion geeignet sind.

Desweiteren zeigten die Heptapeptide eine parallele, jedoch niedrigere Rezeptoraffinität und deshalb eine niedrigere agonistische oder antagonistische Wirkung auf die Aldosteronproduktion im Vergleich zu den Oktapeptiden. Die Differenzen in

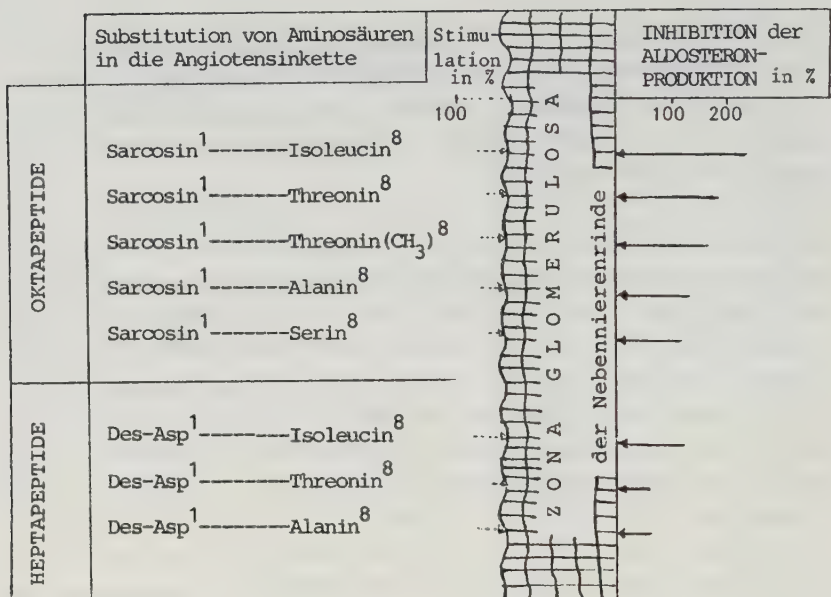


Abb. 23: Substitutionen in der 1. Position mit Methyl-Glycin (Sarcosin) und in der 8. Position mit Isoleucin, Threonon, Alanin oder Serin der Angiotensinkette führen zum Hinzugewinn von spezifischen Eigenschaften, die die Aldosteronproduktion in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde inhibieren. Die Suppression der Aldosteronfreisetzung mit den antagonistischen Angiotensin-Analogen ist ausgeprägt bei den Oktapeptiden, insbesondere mit Verbindungen von Isoleucin und Threonin in der 8. Position. Die Heptapeptid-Antagonisten üben moderate antagonistische Wirkung auf die Aldosteronproduktion aus.

der Aktivität der AII- und AIII-Peptide bei der Inkubation mit Glomerulosazellen sind zum größten Teil in der unterschiedlichen Halbwertszeit beider Hormone begründet. Unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei einer Intensivierung des RAS mit erhöhtem Aldosteronmetabolismus und deutlichem AIII-Output, kann das natürliche AIII eine Stimulation der Aldosteronfreisetzung aus den Glomerulosazellen verursachen (96). In unseren Untersuchungen fanden wir drei AIII-Analoga mit antagonistischen Qualitäten. Verglichen mit den Oktapeptiden demonstrieren die Heptapeptid-Antagonisten eine ähnliche Disposition, jedoch eine niedrigere Aldosteroninhibition als die AII-Antagonisten. Diese Beobachtungen unterstreichen die Annahme, daß die AIII-Wirkung auf die Aldosteronproduktion durch entsprechende AIII-Antagonisten eingeschränkt wird (14,39). Siebtestungen erbrachten drei AIII-Antagonisten, wobei Thr⁷AIII sowie Ala⁷AIII mild inhibierend und Ile⁷AIII stärker und ähnlich der Aktivität der AII-Antagonisten auf die Aldosteronproduktion wirkte. Unsere Daten befinden sich in Übereinstimmung mit denjenigen von Braley et al. (15) über die Auswertung von Ile⁷AIII und Ala⁷AIII. Dabei fanden wir eine relativ hohe antagonistische Potenz von Thr⁷AIII. Obwohl Ile⁷AIII eine starke antagonistische Eigenschaft zeigte, stimmt unser Befund nicht mit dem von Neusy et al. (98) überein, wonach dieser AIII-Antagonist die Oktapeptid-induzierte Aldosteronstimulation deutlicher als AII-Antagonisten inhibiert. Seitdem das natürliche AIII auch als ein potentes Stimulans der Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde gilt, wird dieser AII-Metabolit als ein alternativer Weg zur Beeinflussung der Steroidgenese untersucht (11,20,75). Die AIII-Antagonisten könnten als Inhibitoren der Aldosteronsekretion in Frage kommen. Außerdem spricht das Ausbleiben von akuten vasopressorischen Effekten, so z.B. hypertensiven Reaktionen, bei ihrer Verwendung zu ihren Gunsten.

Das Ausmaß dieser partiell agonistischen Wirkungsqualität reduziert die Effektivität jedes Angiotensin-Antagonisten. Die Konsequenz aus solchen endokrinologischen Veränderungen ist noch weitgehend unklar. Seitdem jedoch die hypotensiv wirkenden Angiotensin-Antagonisten einen Platz in der experimentellen und klinischen Medizin eingenommen haben, werden diejenigen Wirkstoffe mit möglichst niedriger Aldosteronstimulation bevorzugt. Gegenwärtige Studien sind damit befaßt, andere Stoffe als das schon seit 1975 bekannte Saralasin zu synthetisieren und anzubieten. Wenn es auch gelingen sollte, Angiotensin-Antagonisten ohne begleitende agonistische Effekte auf die Aldosteronsekretion zu produzieren, so wäre ihre Anwendung umstritten, weil eine gewisse agonistische Mitwirkung als physiologisch notwendig erscheint. Diese Nebenwirkung muß bei der quantitativen Analyse berücksichtigt werden.

Sar¹Thr⁸AII zeigte sowohl in unseren Untersuchungen als auch in anderen Studien (14,15) niedrigere agonistische Effekte auf die Aldosteronsekretion. Die Ergebnisse auch weiterer Peptide stimmen mit den Resultaten anderer Autoren überein. So fanden Hata et al. (60) dieselbe Charakteristik für Sar¹Ile⁸AII und Sar¹Ala⁸AII. Diese Angiotensinderivate mit Einsatz von Sarcosin in der ersten Position besitzen eine höhere Affinität zu Rezeptoren auf den Membranen der Glomerulosazellen und veranlassen eine geringere Antwortreaktion im Vergleich zu natürlichem Angiotensin.

Der hohe Grad der Rezeptorbindung von Angiotensinen in der glatten Muskulatur unterstreicht ihre wesentliche Rolle in der Regulation des Blutdruckes. Bei der Gegenüberstellung unserer Ergebnisse über die Rezeptorbindung von Angiotensin-Analogen in der glatten Muskulatur mit den Daten anderer Autoren (67, 68) über die Wirkung derselben Stoffe auf den Blutdruck in vivo bei Ratten sowie über ihren Effekt auf die Aortenkontrak-

tion am Kaninchen, wurden hochsignifikante Korrelationen mit der antipressorischen Wirkung von Antagonisten gefunden. Dieselbe Tatsache besteht auch zwischen der Rezeptoraffinität von Angiotensin-Antagonisten und den pA-Werten der Kontraktion der Aortenmuskulatur.

Die untersuchten Dekapeptide und ein Nonapeptid-Metabolit zeigten im Vergleich zu Angiotensin II und III eine geringere Rate an Rezeptoraffinität und damit eine niedrigere Stimulation der Aldosteronproduktion. Braley et al. (15) stellten fest, daß ein Teil des Effektes der Dekapeptide indirekt auf ihre Konversion zu Oktapeptiden zurückzuführen ist. Diese Tatsache wurde durch die Applikation eines ACE-Inhibitors (Captopril) nachgewiesen, wonach der Inhibitor sowohl beim Dekapeptid als auch beim Nonapeptid eine 50%ige Reduktion des Aldosteronoutput verursachte. Das Ausbleiben der vollständigen Inhibition der von Angiotensin I induzierten Aldosteronproduktion läßt auf eine direkte Wirkung der Dekapeptide auf die Glomerulosazellen schließen, die mit ihren spezifischen strukturellen Eigenschaften zusammenhängt. Infolge der Intensivierung des RAS bzw. infolge hoher Plasmaplasma-reninaktivität und großer Anhäufung von AI ist eine multiplikative Wirkung auf die Aldosteronfreisetzung zu erwarten.

Unsere Untersuchungen ergaben, daß manche Angiotensin-Analoga eine höhere Rezeptorbindungsfähigkeit als natürliches AII und AIII haben. Die Angiotensin-Antagonisten wetteifern um Rezeptorstellen, worauf nicht die übliche zelluläre Reaktion folgt. Der Vorgang zwischen der Rezeptorbindung und der darauffolgenden Aldosteronproduktion in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde steht mit bestimmten molekularen Mechanismen in Verbindung. Eine maximale Antwortreaktion kann hervorgerufen werden, wenn eine große Anzahl von Rezeptoren durch einen aktiven Stoff gebunden wird. Die Variationen in der physiolo-

gischen Leistungsfähigkeit von Angiotensin-Analogen sind durch Differenzen in der Rezeptoraffinität und den spezifischen strukturellen Eigenschaften dieser Verbindungen determiniert. Als Beispiel dafür dient der von uns untersuchte AII-Antagonist $\text{Sar}^1\text{Ile}^8\text{AII}$. Es wird angenommen, daß Isoleucin ein allosterischer Inhibitor von Desaminasen ist (30) und im Bindungskomplex die Bindungsstelle verläßt und ins Innere der Zellplasmamembran eindringt, wo es - in Proteinen inkorporiert - länger verweilt. $\text{Sar}^1\text{Ala}^8\text{AII}$ besitzt einen partiell inhibierenden Effekt auf das AI-converting-Enzym und verursacht auf diese Weise eine dosisabhängige Reduktion der Wirkung von AII (55). Die antagonistische Fähigkeit des $\text{Sar}^1\text{Ile}^8\text{AII}$ schwächt die durch das ACTH angeregte Aldosteronproduktion ab (13). Es wird vermutet, daß die AIII-Antagonisten den ACTH-Einfluß auf die Aldosteronsekretion inhibieren. Der Grad der rezeptorgebundenen Degradation von AII und AIII sowie ihren Antagonisten entfaltet sich unterschiedlich, wobei die Antagonisten eine niedrigere Rate besitzen (35). Es wird die Meinung vertreten, daß funktionelle Differenzen in den einzelnen Angiotensinrezeptoren bestehen, die verantwortlich für die unterschiedlichen Antwortreaktionen auf $\text{Sar}^1\text{Ile}^8\text{AII}$ und $\text{Sar}^1\text{Ala}^8\text{AII}$ sind (60). Weiterhin üben extrazelluläre Na^+ -Gradienten einen Einfluß auf die Rezeptorbindung vorzugsweise der Agonisten aus (3). Der veränderte Ca^{2+} -Strom durch die Glomerulosazellen und die Aktivität einiger Zellvorgänge, wie die Glykogenphosphorylierung, können für die Sekretionsprozesse von Aldosteron durch die am meisten sekretionsanregenden Mittel von Bedeutung sein (44).

Aus der gesamten Analyse der erhobenen Befunde kann geschlossen werden, daß die Angiotensin-Analoga in allen drei experimentellen Expositionen - Rezeptorbindung in der glatten Muskulatur, Rezeptorbindung in den Glomerulosazellen der Neben-

nierenrinde sowie Aldosteronproduktion aus der Zona glomerulosa - sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen entfalten und mit dem natürlichen Angiotensin II um die Besetzung der Rezeptorstellen konkurrieren. Glomerulosazellen lassen sich durch Oktapeptide stärker als durch Heptpeptide stimulieren oder inhibieren. Der Grad der Rezeptorbindungsaffinität der einzelnen Angiotensin-Analoga korreliert signifikant mit seiner Fähigkeit zur Stimulation oder Inhibition der Aldosteronproduktion in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß AII und AIII natürlich vorkommende Regulatoren der Aldosteronsekretion sind.

G. ZUSAMMENFASSUNG

In drei Experimenten wurde die Beeinflussung des Angiotensin-Aldosteron-Mechanismus untersucht. Mit 19 Angiotensinverbindungen (AI, AII und AIII) erfolgte das Studium der Rezeptorbindung dieser Peptide a) an der glatten Uterusmuskulatur, b) an Glomerulosazellen der Nebennierenrinde von Ratten und c) mittels Aldosteronproduktion an isolierten Zellen der Zona glomerulosa. Dabei wurde eine radiologische Rezeptorbindungsmethodik zur Prüfung der Rezeptoraffinität und der RIA zur Aldosteronbestimmung verwendet. Die Wirkung verschiedener Angiotensinderivate läßt sich auf diese Weise identifizieren und klassifizieren.

Die Untersuchungen erbrachten eine höhere Rezeptorbindungsaffinität der Oktapeptide als der Heptapeptide; dabei konnte ein ähnliches Verhalten von strukturell korrespondierenden AII- und AIII-Derivaten beobachtet werden. Die AI-Peptide zeigten eine niedrige, dennoch nachweisbare Rezeptorbindungsfähigkeit. Die Rezeptoren in den Glomerulosazellen verfügen über eine größere Bindungsaffinität für die Angiotensine als in den Zellen der glatten Muskulatur. Die Anordnung der Angiotensin-Analoga nach dem Grad ihrer Bindungsfähigkeit war in beiden Systemen ähnlich. Die identische Rangfolge der verschiedenen Analoga und Antagonisten bezüglich ihrer Rezeptoraffinität in beiden Organsystemen läßt auf eine Gleichartigkeit der Rezeptoren in Zona glomerulosa und glatter Muskulatur schließen.

Die Angiotensin-Analoga mit einer Substitution von Sarcosin in die N-terminale Position üben eine Steigerung der Rezeptorbindung aus, verglichen mit natürlichem AII. Bei einer zusätzlichen Substitution einer aliphatischen Aminosäure, wie Isoleucin, Threonin, Alanin oder Serin in die C-terminale

Position der Angiotensinkette, erfolgte der Erwerb weiterer Eigenschaften, die eine noch stärkere Besetzung der Rezeptorstellen und eine inhibierende Wirkung auf die Aldosteronproduktion umfassen. Dabei wurde eine stärkere agonistische oder antagonistische Wirkung auf die Aldosteronfreisetzung durch die AII- als durch die AIII-Analoga gefunden. Außerdem ergaben sich Korrelationen zwischen der Rezeptoraffinität und dem stimulierenden bzw. hemmenden Effekt sowohl der Oktapeptide ($r = 0,78$; $P < 0,005$) als auch der Heptapeptide ($r = 0,85$; $P < 0,05$). Die gemessene Rezeptorbindungsaktivität korrelierte auch positiv signifikant mit den Daten der antipressorischen Wirkung von Antagonisten sowie mit den pA-Werten der Kontraktion der Aortenmuskulatur. Die Werte der Rezeptorbindung der AI-Peptide stimmen signifikant mit den Werten der von ihnen verursachten Aldosteronproduktion überein. Die Resultate ergaben nach der Fähigkeit, die Aldosteronproduktion zu inhibieren, folgende Anordnungsreihe für die Oktapeptide: $\text{Sar}^1\text{Ile}^8\text{AII} > \text{Sar}^1\text{Thr}^8\text{AII} > \text{Sar}^1\text{Thr}(\text{Me})^8\text{AII} > \text{Sar}^1\text{Ala}^8\text{AII} > \text{Sar}^1\text{Ser}^8\text{AII}$; und für die Heptapeptide: $\text{Ile}^7\text{AIII} > \text{Thr}^7\text{AIII} > \text{Ala}^7\text{AIII}$. Daraus folgt, daß $\text{Sar}^1\text{Ile}^8\text{AII}$ und $\text{Sar}^1\text{Thr}^8\text{AII}$ die stärksten Antagonisten sind. Dabei besaßen $\text{Sar}^1\text{Thr}^8\text{AII}$ und $\text{Sar}^1\text{Thr}(\text{Me})^8\text{AII}$ eine höhere Rezeptorbindungsaktivität bei geringerer agonistischer Mitwirkung als $\text{Sar}^1\text{Ile}^8\text{AII}$. Gemessen an ihrer Effektivität übertreffen also drei AII-Antagonisten den bewährten AII-Antagonisten Saralasin. Auch bei drei AIII-Analogen wurde eine antagonistische Wirkung auf die Aldosteronproduktion nachgewiesen, die von einem milden Grad bei Thr^7AIII und Ala^7AIII bis zu einem starken Grad bei Ile^7AIII variierte. Die Untersuchungen ermöglichen Vergleiche der Aktivität verschiedener AI-, AII- und AIII-Analoga und deuten die Möglichkeit an, daß Angiotensin-Analoga in der klinischen Praxis zunehmend an Bedeutung erlangen.

H. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aguilera, G., Catt, K.J.: Participation of voltage-dependent calcium channels in the regulation of adrenal glomerulosa function by angiotensin II and potassium. *Endocrinology* 118, 112-118 (1986).
2. Aguilera, G., Catt, K.J.: Regulation of aldosterone secretion during altered sodium intake. *J. Steroid Biochem.* 19, 525-530 (1983).
3. Aguilera, G., Catt, K.J.: Regulation of vascular angiotensin II receptors in the rat during altered sodium intake. *Circ. Res.* 49, 751-758 (1981).
4. Anderson, B., Anderson, H., Augustinsson, O., Forsgren, M., Holst, H., H. Jonason: Effects of hay-feeding on acid/base balance, renal sodium excretion, aldosterone and vasopressin secretion in the goat. *Acta Physiol. Scand.* 126, 9-14 (1986).
5. Anderson, D.E., Gomez-Sanchez, G., Dietz, J.R.: Suppression of plasma renin and aldosterone in stress salt hypertension in dogs. *Am. J. Physiol.* 251, R181-R186 (1986).
6. Anderson, J.M., Gimbrone, M.A., Jr., Alexander, R.W.: Angiotensin stimulates phosphorylation the myosin light chain in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 256, 4693-4696 (1981).
7. Anderson, J.V., Struthers, A.D., Payne, N.N., Slater, J.D.H., Bloom, S.R.: Atrial natriuretic peptide inhibits the aldosterone response to angiotensin in man. *Clin. Sci.* 70, 507-512 (1986).
8. Atarashi, K., Mulrow, P.J., Franco-Saenz, R.: Effect of atrial peptides on aldosterone production. *J. Clin. Invest.* 76, 1807-1811 (1985).
9. Augustinsson, O., Johansson, K.: Ammonium chloride induced acidosis and aldosterone secretion in the goat. *Acta Physiol. Scand.* 128, 535-540 (1986).
10. Berridge, M.J.: Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220, 345-360 (1984).
11. Blair-West, J.R., Coghlan, J.P., Denton, D.A., Funder, J.W., Scoggins, B.A., Wright, R.D.: The effect of the heptapeptide (2-8) and hexapeptide fragments of angiotensin II on aldosterone secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 32, 575-578 (1971).
12. Bonvalet, J.P., Manillier, C., Farman, N.: Autoradiographic study of thermodependent nucleocytoplasmic distribution of aldosterone binding sites in intact target cells. *J. Steroid Biochem.* 20, 325-328 (1984).

13. Boscaro, M., Al-Dujaili, E.A.S., Edwards, C.R.W.: Effects of two ant-agonists on aldosterone secretion by isolated perfused rat zona glomerulosa cells. *Endocrinology* 108, 2381-2384 (1981).
14. Braley, L.M., Menachery, A.I., Underwood, R.H., Williams, G.H.: Is the adrenal angiotensin receptor angiotensin II- or angioten-sin III-like? *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 102, 116-121 (1983).
15. Braley, L.M., Menachery, A., Williams, G.H.: Angiotensin II-role in mediating angiotensin I-induced and tetradecapeptide-induced steroidogenesis by rat glomerulosa cells. *Endocrinology* 109, 960-965 (1981).
16. Britton, S.L., Ronau, T.F., Metting, P.L.: Evaluation of angiotensin II and III as vasoconstrictors in the hepatic and hindlimb vas-culatures of dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 181, 125-130 (1986).
17. Brooks, V.L., Keil, L.C., Reid, I.A.: Role of the renin-angiotensin system in the control of vasopressin secretion in conscious dogs. *Circ. Res.* 59, 829-838 (1986).
18. Brown, C.P., Venuto, R.C.: Angiotensin II receptor alterations during pregnancy in rabbits. *Am. J. Physiol.* 251, E58-E64 (1986).
19. Bumpus, F.M.: Mechanism and sites of actions of newer angiotensin agonists and antagonists in terms of activity and receptors. *Federation Proc.* 36, 2128-2132 (1977).
20. Bumpus, F.M., Khosla, M.C.: Angiotensin analogs as determinants of the physiologic role of angiotensin and its metabolites. In: *Hypertension. Pathophysiology and Treatment*, Hrsgb.: Genest, J., Koiw, E., Kuchel, O., McGraw-Hill, New York, p. 183 (1977).
21. Bumpus, F.M., Schwarz, H., Page, I.H.: Synthese and pharmacology of the octapeptide angiotensin. *Science* 125, 886-887 (1957).
22. Burgess, G.M., Godfrey, P.P., McKinney, J.S., Berridge, M.J., Irvine, R.F., Putney, Jr., J.W.: The second messenger linking recep-tor activation to internal calcium release in liver. *Nature*, 309, 63-66 (1984).
23. Campbell, D.J.: The site of angiotensin production. *J. Hypertension* 3, 199-207 (1985).
24. Campbell, W.B., Brady, M.T., Gomez-Sanchez, C.E.: Effect of angioten-sin, PGE₂ and indomethacin on the early and late steps of aldosterone biosynthesis in isolated adrenal cells. *J. Steroid Biochem.* 24, 856-870 (1986).
25. Capponi, A.M., Lem, P.D., Jornot, J., Valloton, M.B.: Correlation between cytosolic free Ca²⁺ and aldosterone production in bovine adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 259, 8863-8869 (1984).
26. Carey, R.M., Sen, S.: Recent progress in the control of aldosterone secretion. *Recent Progress Horm. Res.* 42, 251-296 (1986).

27. Carey, R.M., Drake, C.R., Jr.: Dopamine selectively inhibits aldosterone response to angiotensin II in humans. *Hypertension* 8, 399-406 (1986).
28. Carrol, J.E., Laudry, A.S., Elliott, M.E., Goodfriend, T.L.: Effects of pH on adrenal angiotensin receptors and responses. *J. Lab. Clin. Med.* 108, 23-29 (1986).
29. Catt, K.J., Mendelsohn, F.A.C., Millan, M.A., Aguilera, G.: The role of angiotensin II receptors in vascular regulations. *J. Cardiovascular Pharmacol.* 6 suppl. 4, S575-S586 (1984).
30. Cervone, F., Iaccarino, M.: The action of O-methyl-threonine and thiaisleucine on threonine deaminase purified from *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* 26, 56-60 (1972).
31. Chartier, L., Schiffrin, E.L.: Atrial natriuretic peptide inhibits the stimulation of aldosterone secretion by ACTH in vitro and in vivo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 182, 132-136 (1986).
32. Chase, H.S., Jr.: Does calcium couple the apical and basolateral permeabilities in epithelia? *Am. J. Physiol.* 247, F869-F876 (1984).
33. Comperts, B.D.: Involvement of guanine nucleotide-binding protein in the gating of Ca^{2+} by receptors. *Nature* 306, 64-66 (1983).
34. Cortas, N., Abras, E., Arnaout, M., Mooradian, A., Muakasa, S.: Energetics of sodium transport in the urinary bladder of the toad. Effect of aldosterone and sodium cyanide. *J. Clin. Invest.* 73, 46-52 (1984).
35. Crozat, A., Penhoat, A., Saez, J.M.: Processing of angiotensin II (A-II) and (Sar¹Ala⁸) A-II by cultured bovine adrenocortical cells. *Endocrinology* 118, 2312-2318 (1986).
36. Delarue, C., Perroteau, I., Lirhman, I., Netchitailo, P., Homo-Delarche, F., Vaudry, H.: Role of prostaglandins in steroidogenesis by frog internal gland in vitro. *Prostaglandins* 31, 5-17 (1986).
37. DeLean, A., Racz, K., McNicol, N., Desrosiers, M.L.: Direct beta-adrenergic stimulation of aldosterone secretion in cultured bovine adrenal subcapsular cell. *Endocrinology* 115, 485-492 (1984).
38. Devynck, M.A., Pernollet, M.G., Matthews, P.G., Khosla, M.C., Bumpus, F.M., Meyer, P.: Specific receptors for des-asp angiotensin II ("angiotensin III") in rat adrenals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4029-4032 (1977).
39. Douglas, J.G., Khosla, M.C., Bumpus, F.M.: Efficacy of octa- and heptapeptide antagonists of angiotensin II as inhibitor of angiotensin III binding in the rat adrenal glomerulosa. *Endocrinology* 116, 1598-1602 (1985).
40. Douglas, J.G.: Potassium ion as a regulator of adrenal angiotensin II receptors. *Am. J. Physiol.* 239, E317-E321 (1980).
41. Douglas, J.G., Michailov, M., Khosla, M.C., Bumpus, F.M.: Comparison of octa- and heptapeptide antagonists of angiotensin II as inhibitors of angiotensin II-induced steroidogenesis in the rat adrenal glomerulosa. *Endocrinology* 109, 94-98 (1981).

42. Elliott, M.E., Goodfriend, T.L.: Atrial natriuretic peptide inhibits protein phosphorylation stimulated by angiotensin II in bovine adrenal glomerulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 140, 814-820 (1986).
43. Elliott, M.E., Hadjokas, N.E., Goodfriend, T.L.: Effects of ouabain and potassium on protein synthesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 118, 1469-1475 (1986).
44. Elliott, M.E., Siegel, F.L., Hadjokas, N.E., Goodfriend, T.L.: Angiotensin effects on calcium and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 116, 1051-1059 (1985).
45. Farese, R.V.: Phospholipids as intermediates in hormone action. *Moll. Cell. Endocrinol.* 35, 1-14 (1984).
46. Fidelman, M.L., Mikulesky, D.C.: Network thermodynamic modeling of hormone regulating of active Na^+ transport in cultured renal epithelium (AG). *Am. J. Physiol.* 250, C978-C991 (1986).
47. Francis, G.S.: Development of arrhythmias in the patient with congestive heart failure: pathophysiology, prevalence and prognosis. *Am. J. Cardiol.* 57, 3B-7B (1986).
48. Funder, J.W.: Aldosterone receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 196, 145-152 (1986).
49. Garty, H.: Mechanism of aldosterone action in tight epithelia. *J. Membrane Biol.* 90, 193-205 (1986).
50. Gavras, H., Flessas, A., Ryan, T.J., Brunner, H.R., Gavras, I.: Treatment of congestive cardiac failure in a high-renin hypertension. *JAMA* 238, 880-882 (1977).
51. Geering, K. Claire, M., Gaeggeler, H.-P., Rossier, B.C.: Receptor occupancy vs. induction of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and Na^+ transport by aldosterone. *Am. J. Physiol.* 248, C102-C108 (1985).
52. Goodfriend, T.L., Ball, D.L.: Fatty acid effects on angiotensin receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8, 1276-1283 (1986).
53. Gross, F.: Renin und Hypertension, physiologische oder pathophysiologische Wirkstoffe? *Klin. Wochenschr.* 36, 693-706 (1958).
54. Gross, M.D., Grekin, R.J., Gniadeck, T.C., Virillareal, J.Z.: Suppression of aldosterone by cyproheptadine in idiopathic aldosteronism. *New Eng. J. Med.* 305, 181-185 (1981).
55. Gross, P.B., Dallemague, C., Beswick, E., Khosla, M.C., Bumpus, F.M.: A cardiac specific analog of angiotensin I potentiated by converting enzyme inhibition. *Life Sci.* 36, 613-618 (1985).
56. Guillemette, G., Guillon, G., Marie, J., Pantaloni, C., Baleste, M.N., Escher, E., Jard, S.: Angiotensin-induced changes in the apparent size of rat liver angiotensin receptors. *J. Recept. Res.* 4, 267-281 (1984).

57. Hall, J.E.: Regulation of glomerular filtration rate and sodium excretion by angiotensin II. *Federation Proc.* 45, 1431-1437 (1986).
58. Haller, H., Hensen, J., Bähr, V., Oelkers, W.: Effects of angiotensin II infusion on the early morning surge of ACTH and on o-CRH-provoked ACTH secretion in normal man. *Acta Endocrinol.* 112, 150-156 (1986).
59. Harris, P.J., Navar, L.G.: Tubular responses to angiotensin. *Am. J. Physiol.* 248, F621-F630 (1985).
60. Hata, T., Ogihara, T., Mikami, H., Nakamura, M., Mandai, T., Kumahara, Y.: Effects of two angiotensin II analogues on blood pressure, plasma aldosterone concentration, plasma renin activity and creatinine clearance in normal subjects on different sodium intake. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 18, 295-299 (1980).
61. Hindami, R.K., Al-Dujaili, E.A.S., Padfield, P.L.: The role of prostaglandins in aldosterone and corticosterone secretion by isolated perfused rat zona glomerulosa cell. *Prostaglandins. Leukotriens Med.* 20, 121-128 (1985).
62. Horinchi, T., Tanaka, K., Shimizu, N.: Mechanism of action of aldosterone release by prostaglandin E in isolated rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinol. Jap.* 32, 529-536 (1985).
63. Kaufman, L.J., Vollmer, R.R.: Endogenous Angiotensin II facilitates sympathetically mediated hemodynamic response in pithed rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235, 128-134 (1985).
64. Keller, H., Kirste, G., Wilms, H., Knauf, H.: Einfluß des Angiotensin II Analogons - Saralasin - bei Spendernierenentnahme auf die primäre Transplantatfunktion. *Urologe (A)* 25, 113-115 (1986).
65. Keller-Wood, M., Kimura, B., Shinsako, J., Phillips, I.: Interactions between CFR and angiotensin II in control of ACTH and adrenal steroids. *Am. J. Physiol.* 250, R396-R402 (1986).
66. Khosla, M.C.: Synthesis and pharmacology of nonmammalian angiotensins and their evolutionary development. *Peptides* 6 suppl. 3, 289-293 (1985).
67. Khosla, M.C., Hall, M.M., Munoz-Ramirez, H., Khairallah, P.A., Bumpus, F.M.: Synthesis of (1-sarcosin,8-o-methylserine)angiotensin II and 1-substituted analogues of (8-threonine)angiotensin II as antagonists of angiotensin II. *J. Med. Chem.* 20, 253-256 (1977).
68. Khosla, M.C., Hall, M.M., Smeby, R.R., Bumpus, F.M.: Factors that influence antagonistic properties of angiotensin II antagonists. *J. Med. Chem.* 16, 829-832 (1973).
69. Koczorek, K.R., von Bubnoff, M., Riecker, G.: Acidose und Aldosteron. *Klin. Wochenschr.* 40, 113-116 (1962).
70. Kojima, I., Kojima, K., Ogata, E.: Phorbol ester inhibit angiotensin-induced activation of phospholipase C in adrenal glomerulosa cells. Its implication in the sustained action of angiotensin. *Biochem. J.* 237, 253-258 (1986).

71. Kojima, I., Kojima, K., Rasmussen, H.: Possible role of phospholipase A₂ action and arachidonic acid metabolism in angiotensin II-mediated aldosterone secretion. *Endocrinology* 117, 1057-1060 (1985).
72. Kojima, I., Kojima, K., Shibata, H., Ogata, E.: Mechanism of cholinergic stimulation of aldosterone secretion in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 119, 284-231 (1986).
73. Kojima, I., Kojima, K., Kreutter, D., Rasmussen, H.: The temporal integration of the aldosterone secretory response to angiotensin occurs via two intracellular pathways. *J. Biol. Chem.* 259, 14448-14457 (1984).
74. Kono, T., Taniguchi, A., Imura, H., Oseko, F., Khosla, M.C.: Agonistic activity of isoleucin⁸-angiotensin II in man. *Endocrinol. Jap.* 32, 701-708 (1985).
75. Kono, T., Taniguchi, A., Imura, H., Oseko, F., Khosla, M.C.: Biological activities of angiotensin II-(1-6)-heptapeptide and angiotensin II-(1-7)-heptapeptide in man. *Life Sci.* 38, 1515-1519 (1986).
76. Lineweaver, H., Burk, D.: The determination of enzyme dissociation constants. *J. A. Chem. Soc.* 56, 658-660 (1934).
77. Lobo, M.V., Marusic, E.T.: Effect of angiotensin II, ATP, and ionophore A23187 on potassium efflux in adrenal glomerulosa cells. *Am. J. Physiol.* 250, E125-E130 (1986).
78. Loche, S., Petraglia, F., Pintor, C., Faedda, A., Facchinetti, F., Balzano, S., Genazzani, A.R., Corda, R.: The effect of an enkephalic analogue on aldosterone secretion in normal subjects. *Neuroendocrinology Letters* 7, 313-317 (1985).
79. Mantero, F., Opocher, G., Boscaro, M., Armanini, D.: Effect of serotonin on plasma aldosterone in man. *J. Endocrinol. Invest.* 5, 97-99 (1982).
80. Marshall, G.R., Vine, W., Needleman, P.: Specific competitive inhibitor of angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1624-1630 (1970).
81. Marver, D.: Models of aldosterone action on sodium transport: Emerging concepts. *Adv. Exp. Biol. Med.* 196, 153-171, (1986).
82. Matsoukas, J.M., Moore, G.J.: Proton magnetic resonance studies of angiotensin II conformation: cis-trans isomerism in sarcosine⁷-containing analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* 243, 419-423 (1986).
83. Matsoukas, J.M., Coghari, M.H., Scanlon, M.N., Franklin, K.J., Moore, G.J.: Synthesis and biological activities of analogs of angiotensin-II and angiotensin-III containing O-methyl-tyrosine and D-triptophan. *J. Med. Chem.* 28, 780-783 (1985).
84. Matsuoka, H., Mulrow, P.J., Franco-Saenz, R., Li, C.H.: Effects of β -lipotropin-derived peptides on aldosterone production in rat adrenal gland. *J. Clin. Invest.* 68, 752-759 (1981).

85. Mazzocchi, G., Robba, C., Rebuffat, P., Nussdorfer, G.G.: Effects of prolactin administration on the zona glomerulosa of the rat adrenal cortex: Stereology and plasma hormone concentrations. *Acta Endocrinol.* 111, 101-105 (1986).
86. Mendelssohn, F.A.O., Dunbar, M., Allen, A., Chou, S.T., Millan, M.A., Aguilera, G., Catt, K.J.: Angiotensin II receptors in the kidney. *Federation Proc.* 45, 1420-1425 (1986).
87. Merrifield, R.B.: Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154 (1963).
88. Mettauer, B., Rouleau, J.L., Bichet, D., Juneau, C., Kortas, C., Barjon, J.-N., de Champlain, J.: Sodium and water excretion abnormalities in congestive heart failure. Determinant factors and clinical implications. *A. Intern. Med.* 105, 161-167 (1986).
89. Michailov, M.L., Schad, H., Jakob, I.C.M., Brechtelsbauer, H.: Renin-angiotensin system responses of acute graded hemorrhage in dogs. *Circ. Shock.* 21, 217-224 (1987).
90. Michailov, M.L.: Der Einfluß von Angiotensin II auf das Muster der freien Fettsäuren im Blutplasma bei zwei verschiedenen Hypertonie-modellen am Kaninchen. *Cor Vasa* 17, 285-291 (1975).
91. Michailov, M.L.: Die Wirkung von Angiotensin II auf die Zusammensetzung der freien Fettsäuren im Blutplasma am Kaninchen. *Biochem. Pharmacol.* 23, 2625-2628 (1974).
92. Moore, G.J.: Kinetics of acetylation-deacetylation of angiotensin II. Intramolecular interactions of the tyrosine and histidine side-chains. *Int. J. Peptide Protein Res.* 26, 469-481 (1985).
93. Morris, C.P.: Further studies on aldosterone metabolism. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 5, 94-102 (1986).
94. Mujais, S.K., Kaufman, S., Katz, A.I.: Angiotensin II binding sites in individual segments of the rat nephron. *J. Clin. Invest.* 77, 315-318 (1986).
95. Müller, J.: Divergent effects of dietary chloride restriction on aldosterone biosynthesis and the renin-angiotensin system in rats. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 112, 105-113 (1986).
96. Naruse, M., Naruse, K., Kurimoto, F., Sakurai, H., Yoshida, S., Toma, H., Ishii, T., Obana, K., Demura, H., Inagami, T., Shizume, K.: Evidence for the existence of des-asp¹-angiotensin II in human uterine and adrenal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61, 480-483 (1985).
97. Navar, L.G., Rosivall, L., Carmines, P.K., Oparil, S.: Effects of locally formed angiotensin II on renal hemodynamic. *Federation Proc.* 45, 1448-1453 (1986).
98. Neusy, A.J., Pessah, M., Steele, J.M., Lowenstein, J.: Effect of a heptapeptide angiotensin analog on aldosterone secretion in the rabbit. *Kidney Int.* 17, 66-73 (1980).

99. Ogawa, K., Hara, A., Matsunaga, M., Pak, C.H., Koninski, T., Kawai, C.: Angiotensin II analogue infusion test in renovascular hypertension under low sodium intake and under spironolactone administration: Is angiotensin II analogue infusion test useful in determining the mode of treatment? *Tohoku J. exp. Med.* 143, 327-333 (1984).
100. Ohkubo, H., Nakayama, K., Tanaka, T., Nakanishi, S.: Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of heterogeneity. *J. Biol. Chem.* 261, 319-323 (1986).
101. Opocher, G., Murgia, A., Rocco, S., D'Agostino, D., Boscaro, M., Menegus, A., Mantero, F.: Effect of verapamil on the aldosterone-stimulating properties of metoclopramide: In vitro and in vivo studies. *Horm. Metab. Res.* 18, 775-778 (1986).
102. Paller, M.S., Hostetter, T.H.: Dietary protein increases plasma renin and reduced pressor reactivity to angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 251, F34-F39 (1986).
103. Palmer, L.G., Speez, N.: Stimulation of apical Na permeability and basolateral Na pump of toad urinary bladder by aldosterone. *J. Am. Physiol.* 250, F273-F278 (1986).
104. Pedersen, E.B., Danielson, H., Jensen, T., Madsen, M., Sørensen, S.S., Thomsen, O.Ø.: Angiotensin II, aldosterone and arginine vasopressin in plasma in congestive heart failure. *Eur. J. Clin. Invest.* 16, 56-60 (1986).
105. Perroteau, I., Netchitailo, P., Delarue, C., Leboulenger, F., Vaudry, H.: Role of exogenous prostaglandins in steroidogenesis by isolated frog intrarenal gland: Evidence for dissociation in ACTH and angiotensin action. *Endocrinology* 115, 1765-1773 (1984).
106. Pont, A., Williams, P.L., Loose, D.S., Feldman, D., Reitz, R.E., Bochra, C., Stevens, D.A.: Ketoconazole blocks adrenal steroid synthesis. *Ann. Intern. Med.* 97, 370-372 (1982).
107. Punzengruber, C., Silberbauer, K.: Effect of angiotensin II infusion on a prostaglandin I₂-metabolite and on left ventricular function. *Basic Res. Cardiol.* 81, 283-288 (1986).
108. Rabinowe, S.L., Taylor, T., Dluhy, R.G., Williams, J.H.: β -Endorphin stimulates plasma renin and aldosterone release in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60, 485-489 (1985).
109. Radke, K.J., Taylor, Jr., R.E., Schneider, E.G.: Effect of hydrogen ion concentration on aldosterone secretion by isolated perfused canine adrenal glands. *J. Endocrinol.* 110, 293-301 (1986).
110. Raff, H., Levy, S.A.: Renin-angiotensin II/aldosterone and ACTH-cortisol control during acute hypoxemia and exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Dis.* 133, 396-399 (1986).
111. Robba, C., Mazzocchi, G., Nussdorfer, G.G.: Further studies on the inhibitory effects of somatostatin on the growth and steroidogenic capacity of rat adrenal zona glomerulosa. *Exp. Pathol.* 29, 77-82 (1986).

112. Rocco, S., Bescaro, M., D'Agostino, D., Armanini, D., Opocher, G., Mantero, F.: Effect of ketanserin on the in vitro regulation of aldosterone. *J. Hypert.* 4 suppl. 1, S51-S54 (1986).
113. Rodbard, D., Rayford, P.L., Cooper, J.A., Ross, G.T.: Statistical quality control of radioimmunoassays. *J. Clin. Endocrinol.* 28, 1412-1418 (1968).
114. Rodbard, D., Bridson, W., Rayford, P.L.: Rapid calculation of radioimmunoassay results. *J. Lab. Clin. Med.* 74, 770-781 (1969).
115. Rouzaire-Dubois, B., Devynck, M.A., Chevillotte, E., Meyer, P.: Angiotensin receptor in rat uterine membranes. *FEBS Lett.* 55, 168-172 (1975).
116. Saito, I., Takeshita, E., Saruta, T., Nagano, S., Sekihara, T.: Effect of a calcium entry blocker on blood pressure, plasma renin activity, aldosterone and catecholamines in normotensive subjects. *Clin. Endocrinol.* 24, 562-570 (1986).
117. Sawada, S., Taoyda, T., Takamatsu, H., Niwa, I., Maebo, N., Tsuji, H., Nakagawa, M., Ljichi, H.: Prostacyclin generation by cultured human vascular endothelial cells with reference to angiotensin I-converting enzyme. *Jap. Circulation J.* 50, 242-247 (1986).
118. Scanlou, M.N., Matsoukas, J.M., Franklin, K.J., Moore, G.J.: A new approach to angiotensin antagonists: Methylation of the tyrosine hydroxyl in angiotensin II. *Life Sci.* 34, 317-321 (1984).
119. Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672 (1949).
120. Schiebinger, R.J., Braley, L.M., Menachery, A., Williams, G.H.: Calcium, a "third messenger" of cAMP-stimulated adrenal steroid secretion. *Am. J. Physiol.* 248, E89-E94 (1985).
121. Schneider, E.G., Kramer, R.E.: Effect of osmolality on angiotensin-stimulated aldosterone production by primary cultures of bovine adrenal glomerulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 139, 46-51 (1986).
122. Schuster, V.L.: Effects of angiotensin on proximal tubular reabsorption. *Federation Proc.* 45, 1444-1447 (1986).
123. Schwyzer, R., Iselin, B., Kappeler, H., Rinker, B., Rittel, W., Zuber, H.: Synthese von Hypertensin-Peptiden. *Chimia (Aarau)* 11, 335-336 (1957).
124. Sen, S., Valenzuela, R., Smeby, R.R., Bravo, E.L., Bumpus, F.M.: Localization, purification and biological activity of a new aldosterone-stimulating factor. *Hypertension* 3, 81-86 (1981).
125. Shibata, H., Kojima, I., Ogata, E.: Diazepam inhibits potassium-induced aldosterone secretion in adrenal glomerulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 135, 994-999 (1986).
126. Simplicini, A., Rossi, G.P., Bongiovi, S., Perissinotto, F., Saina, B., Mozzato, M.G., Pessina, A.C.: Time course of changes in blood pressure, aldosterone and body fluids during enalapril treatment: a double blind randomized study as hydrochlorothiazide plus propranolol in essential hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. & Physiol.* 13, 17-24 (1986).

127. Simpson, S.A., Tait, J.F.: Quantitative method for bioassay of effect of adrenal cortical steroids on mineral metabolism. *Endocrinology* 50, 150-161 (1952).
128. Sowers, J.R., Catania, R., Paris, J., Tuck, M.: Effects of bromocriptine on renin, aldosterone, and prolactin responses to posture and metoclopramide in idiopathic edema: possible therapeutic approach. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54, 510-516 (1982).
129. Stein, N., Tuck, M., Ozaki, L., Krall, F.: Dopaminergic binding and inhibitory effect in the bovine adrenal zona glomerulosa. *Hypertension* 8, 203-210 (1986).
130. Steinhausen, M., Kücherer, H., Parekh, N., Weis, S., Wiegman, D.L., Wilhelm, K.-R.: Angiotensin II control of the renal microcirculation: Effect of blockade by saralasin. *Kidney Int.* 30, 56-61 (1986).
131. Swales, J.D., Loudon, M., Bing, R.F., Thurston, H.: Renin in the arterial wall. *Clin. Exp. Hypertens. (A)* 5, 1127-1136 (1983).
132. Uchida, K., Azukizawa, S., Imaizumi, N., Kigoshi, H., Yamamoto, I., Hosojima, H., Morimoto, S.: Effect of angiotensin II on aldosterone and its precursors steroid production in adrenal zona glomerulosa cells from heparin-treated rat. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 111, 222-227 (1986).
133. Vecsei, P., Gless, K.H.: Aldosteron-Radioimmunoassay. Enke Verlag, Stuttgart (1975).
134. Vetter, W., Vetter, H., Siegenthaler, W.: Radioimmunoassay for aldosterone without chromatography. *Acta Endocrinol.* 74, 558-567 (1973).
135. Waeber, B., Nussberger, J., Schaller, M.D., Gomez, H.J., Brunner, H.R.: Dopaminergic control of aldosterone secretion in hypertensive patients chronically treated with a angiotensin converting enzyme inhibitor. *Horm. Metab. Res.* 18, 60-63 (1986).
136. Wilson, J.X., Aguilera, G., Catt, K.J.: Inhibitory actions of calmodulin antagonists on steroidogenesis in zona glomerulosa cells. *Endocrinology* 115, 1357-1363 (1984).
137. Witzgall, H., Behr, J.: Effects of potassium loading in normal man on dopaminergic control of mineralcorticoids and renin release. *J. Hypertens.* 4, 201-205 (1986).
138. Witzgall, H., Lorenz, R., von Werder, K., Weber, P.C.: Dopamine reduces aldosterone and 18-hydroxy-corticosterone response to angiotensin II in patients with essential low-renin hypertension and idiopathic hyperaldosteronism. *Clin. Sci.* 68, 291-299 (1985).
139. Witzgall, H., von Werder, K., Weber, P.C.: Mineralcorticoid and prolactin response to the dopamin antagonist metoclopramide in patients with primary aldosteronism. *J. Steroid Biochem.* 19, 1671-1676 (1983).

140. Witzgall, H., Thayl, G., Weber, P.C.: Rapid increase of mineralcorticoids after furosemide in low-renin essential hypertension: Evidence for 18-hydroxycorticosterone to be a better marker than aldosterone. *Klin. Wochenschr.* 60, 847-852 (1982).
141. Yanagibashi, K., Haniu, M., Shively, J.E., Shen, W.H., Hall, P.: The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex: Two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11 β -, 18-hydroxylation and aldehyde synthesis. *J. Biol. Chem.* 261, 3556-3562 (1986).
142. Yasujima, M., Abe, K., Tanno, M., Kohzuki, M., Omata, K., Kasai, Y., Kudo, K., Tsunoda, K., Sato, M., Chiba, S., Yoshinaga, K.: Effects of sodium and angiotensin II on urinary active and inactive kallikrein in rats. *J. Hypertens.* 4, 13-18 (1986).
143. Yukioka, T., Yukioka, N., Aulick, L.H., Godwin, C.W., Mason, A.D., Jr., Sugimoto, T., Pruitt, B.A., Jr.: Evaluation of (1-sarcosin-8-isoleucine)angiotensin II as a therapeutic agent for oleic acid-induced pulmonary edema. *Surgery* 99, 235-244 (1986).
144. Zhuo, J., Harris, P.J., Skinner, S.L.: Modulation of proximal tubular reabsorption by angiotensin II. *Clin. Exp. Pharmacol. & Physiol.* 13, 277-281 (1986).

D A N K S A G U N G

Mein Dank gilt

Herrn PD Dr. H. Witzgall für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit;
desweiteren der Weltgesundheitsorganisation für die
Gewährung eines Forschungsaufenthaltes und der
Cleveland Clinic Foundation für die Überlassung der
Thematik.

L E B E N S L A U F

Am 30. Januar 1930 wurde ich als Sohn des Finanzbeamten Ljubomir Michailov und seiner Ehefrau Mina, geb. Mintchev in Luta, Kreis Ferdinand / Bulgarien geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Lom und Sofia von 1936 -43 trat ich in das Iwan-Wasov-Gymnasium in Sofia ein. Dort legte ich 1948 das Abitur ab. Im gleichen Jahr nahm ich das Medizinstudium an der Universität Sofia auf, das ich 1955 mit dem Staatsexamen und der Promotion abschloß.

1955-58 war ich als Landarzt in Kula, Bezirk Widin eingesetzt. 1959-66 arbeitete ich als Assistenzarzt in der Universitätsklinik Sofia, wo ich die Facharztausbildung für Innere Medizin erwarb. Von 1962-69 war ich Honorarassistent am Lehrstuhl für Pharmakologie. 1967-69 nahm ich im Institut für Ärztliche Fortbildung Sofia als wissenschaftlicher Mitarbeiter an verschiedenen Forschungsprojekten teil. 1970-77 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Zentralinstitut für Herz- und Kreislaufforschung der Akademie der Wissenschaften der DDR in Berlin-Buch tätig. 1978-80 beteiligte ich mich im Auftrag der WHO an Forschungsaufgaben in der Cleveland Clinic Foundation sowie an der University of San Francisco. Ein weiterer Forschungsaufenthalt in den USA folgte 1983-84 an der University of St. Louis.

Annähernd 80 Publikationen veröffentlichte ich in verschiedenen internationalen Zeitschriften.

Seit 1970 bin ich mit der deutschen Bürgerin Dr. Hannelore Michailov-Beger verheiratet.

